

Univerzita Karlova v Praze

---

2. lékařská fakulta

Dizertačná práca

**Etiológia detských akútnych leukémií**

**Mgr. Tatiana Burjanivová**

---

školitel: MUDr. Jan Zuna, PhD.

Praha, 2006

## **Pod'akovanie**

Rada by som sa úprimne poďakovala svojmu školiteľovi Dr. J. Zunovi a vedúcemu Laboratória molekulárnej genetiky Kliniky detskej hematológie a onkológie UK 2. LF a FN Motol doc. J. Trkovi ako za odbornú a metodickú pomoc, tak za zasvätenie do problematiky detských akútnych leukémií a za dôsledné vedenie v priebehu postgraduálneho štúdia. Dr. E. Mejstříkovej, Mgr. M. Váškovéj, Bc. K. Mužíkovéj, Dr. Z. Zemanovej a Dr. T. Kalinovi ďakujem za spoluprácu na spoločných projektoch. Takisto si cením množstvo rád, ktoré mi počas môjho štúdia dali Dr. J. Madžo, Dr. E. Froňková a Mgr. J. Starková.

V neposlednom rade ďakujem všetkým ostatným kolegom a priateľom z pracovnej skupiny CLIP (Childhood Leukaemia Investigation Prague).

## Obsah

Úvod.....	4
Detské akútne myeloidné leukémie .....	4
Etiológia leukémií .....	6
Prenatálny pôvod detských leukémií .....	9
Charakteristika a backtracking sekundárnych leukémií spojených s translokáciami génu MLL.....	14
Charakteristika vyšetrovaných markerov .....	16
Tandemová duplikácia génu FLT3 .....	16
Translokácia AML1/ETO .....	18
Fúzny gén CBFbeta/MYH11 .....	20
Translokácia PML/RARalfa .....	21
Prestavby MLL génu.....	24
Ciele .....	27
Metodika .....	28
Výsledky .....	32
Diskusia.....	38
Záver .....	42
Zoznam použitých skratiek.....	43
Referencie .....	47
Prílohy .....	59

# Úvod

## Detské akútne myeloidné leukémie

Detské akútne leukémie predstavujú heterogénnu skupinu onkologických ochorení. Podľa bunkového pôvodu, klinických prejavov a molekulárnych a chromozomálnych zmien sa delia na dva subtypy: akútnu myeloidnú leukémiu a akútnu lymfoblastickú leukémiu.

Akútna lymfoblastická leukémia (ALL) predstavuje najčastejšiu formu leukémie v detskom veku. Akútna myeloidná leukémia (AML) sa vyskytuje prevažne u dospelých, u detí je vzácnejšia. V Českej republike na jedného detského pacienta s AML pripadá asi 5 detí s ALL. AML sa vyskytujú prevažne u starších detí. Vrchol výskytu detských ALL je medzi 1-5 rokom života, čo je obdobie vývoja imunity voči najčastejším vírusovým infekciám.

Úspešnosť liečby detských akútnych myeloidných leukémií je v porovnaní s akútnymi lymfoblastickými leukémiami nižšia a vyliečiť sa darí asi len 40-50% pacientov (pri ALL je to asi 70-90%) (Creutzig, Reinhardt et al. 2001; Stary, Gajdos et al. 2003).

Pre čo najefektívnejšiu liečbu je kľúčové správne a presné určenie diagnózy akútnej myeloidnej leukémie. K tomu sú potrebné spoľahlivé morfológické, imunologické a cytogenetické vyšetrenia kostnej drene a periférnej krvi pacienta v čase diagnózy. Na podklade nálezu je potom určený typ ochorenia a stanovený liečebný postup.

AML sa podľa tzv. FAB (francúzko-americko-britskej) klasifikácie, vychádzajúcej z morfológických a cytochemických znakov, delí na 8 podtypov (M0-M7).

V súčasnosti existujú dva modely vzniku leukémie. Prvý predpokladá, že iniciálna mutácia zasahuje bunky v rôznych neskorších štádiách hematopoézy, ktoré sa po transformácii ďalej nemenia. Druhý model tvrdí, že mutácia vzniká v pluripotentnej hematopoetickej kmeňovej bunke, ktorá sa pod vplyvom pôsobenia onkogénu diferencuje na konkrétny typ leukémie. Skutočnosť, že na vznik žiadnej AML pravdepodobne nestačí iba jedna mutácia, môže prispievať k heterogenite tohoto ochorenia. Spolupôsobenie

mutácie I. triedy (udeľujúcej bunke proliferačnú výhodu) a mutácie II. triedy (zabraňujúcej diferenciácii) v jednej hematopoetickej bunke ju transformuje na bunku leukemickú (Dash and Gilliland 2001).

Klinické príznaky leukémie vyplývajú z infiltrácie kostnej drene leukemickými blastami a následného poklesu normálnej hematopoézy. Choroba sa prejavuje bledosťou, únavou, horúčkami, krvácaním do kože a slizníc, bolesťami kĺbov, anorexiou a poklesom hmotnosti. Pri niektorých typoch sa vyskytuje hyperplázia gingív a leukemická infiltrácia kože. Hlavne v oblasti hlavy sa vzácne môžu vyskytnúť aj solídne tumory z myeloblastov – chlorómy. Diagnóza AML sa určuje z aspirátu kostnej drene, ktorý obsahuje viac ako 20-30% blastov.

Kľúčový diagnostický a prognostický význam pri AML má detekcia chromozomálnych aberácií. Za priaznivé prognostické znaky sú považované translokácie t(8;21), t(15;17) alebo t(16;16)/inverzia chromozómu 16 (Raimondi, Chang et al. 1999), naopak nálezy monozómie chromozómu 5 alebo 7, inverzie chromozómu 3, komplexných translokácií, a väčšiny translokácií génu MLL sú spojené s nepriaznivou prognózou. Okrem uvedených aberácií majú nepriaznivú prognózu aj pacienti s tandemovou duplikáciou FLT3 génu (FLT3/ITD) (Pui, Schrappe et al. 2004).

V našej štúdii sme sa zaoberali prenatálnym pôvodom prestavieb génu MLL, aberácií t(8;21), t(15;17) t(16;16)/inv(16) a FLT3/ITD, ktoré sa vyskytujú pri takmer polovici detských AML (Raimondi, Chang et al. 1999; Meshinchi, Woods et al. 2001).

Uvedené mutácie sú detailnejšie analyzované v kapitole Charakteristika vyšetrovaných markerov. Najčastejšie chromozomálne aberácie u detí s AML sú v tabuľke 1.

<b>Tab. 1</b> Chromozomálne aberácie u detí s AML a korelácia s FAB subtypmi (Pui, Schrappe et al. 2004)			
<b>Karyotyp</b>	<b>genetická aberácia</b>	<b>korelácia s FAB</b>	<b>frekvencia (%)</b>
t(8;21)(q22;q22)	AML1/ETO	M2, eozinofília	12–15
11q23 abnormality	MLL prestavby	M4, M5	10–15
t(9;11)(p21-22;q23)	MLL/AF9	M5	6–8
t(15;17)(q22;q12-21)	PML/RARalfa	M3, M3v	8–10
Inv16(p13q22)/t(16;16)(p13;q22)	CBFbeta/MYH11	M4Eo	6–8
t(10;11)(p13;q21)	AF10/CALM	rôzny	2
t(6;9)(p23;q34)	DEK/CAN	M2, bazofília	1
t(8;16)(p11;p13)/inv(8)(p11q13)	MOZ/CBP/TIF2	M4, M5	1
t(1;22)(p13;q13)	RBM15/MKL1	M7	< 1
t(3;5)(q25;q34)	NPM/MFL1	M2	< 1
t(9;22)(q34;q11)	BCR/ABL	M1	< 1
t(11;20)(p15;q11)	NUP98/TOP1	-	< 1
monozómia 7 alebo 7q delécia		dysplázia	2
trizómia 8		rôzny	2
trizómia 21		M7	2
komplexná translokácia		rôzny	10–15
normálny		rôzny	20–25

## **Etiológia leukémií**

Napriek intenzívnemu výskumu leukémií ich etiológia zatiaľ nie je úplne objasnená. V súčasnosti sa zdá najpresvedčivejšia infekčná teória vzniku leukémií, ktorú ako prvý formuloval v roku 1988 profesor Mel Greaves (Greaves 1988). Jeho model vysvetľuje vrchol incidencie detských ALL vo vekovej skupine 1-5 ročných detí, ktorý je

výrazný najmä vo vyspelých krajinách. Vychádza z dvojzásahovej teórie mechanizmu leukemogenézy. Prvá mutácia vzniká pravdepodobne vždy alebo takmer vždy prenatálne, druhá je dôsledkom patologickej imunitnej odpovede voči bežným detským infekciám spravidla práve v predškolskom veku. Podľa profesora Greavesa je pre správnu funkciu imunitného systému potrebná jeho správna stimulácia, „naštartovanie“ v kojenskom veku. Pre dobre fungujúcu imunitu v neskoršom veku je tak dôležitá expozícia kojencov a batoliat bežným infekciám. Oneskorená expozícia nepripraveného imunitného systému môže vyvolať patologickú reakciu a spustiť leukémiu.

Znížený kontakt s infekčnými agens v tomto veku je význačným rysom krajín s lepšimi socioekonomickými podmienkami, čo môže vysvetľovať zvýšenú incidenciu detských leukémií v týchto krajinách (Hrusak, Trka et al. 2002; Greaves 2006). Existujú viaceré epidemiologické štúdie, ktoré nepriamo potvrdzujú Greavsovú infekčnú teóriu vzniku leukémie. V týchto prácach bola pozorovaná vyššia incidencia pacientov s leukémiami u detí, ktoré nechodili do kolektívu, v porovnaní s deťmi vyrastajúcimi v kolektíve (Petridou, Kassimos et al. 1993; Infante-Rivard, Fortier et al. 2000; Ma, Buffler et al. 2002; Perrillat, Clavel et al. 2002; Jourdan-Da Silva, Perel et al. 2004; Gilham, Peto et al. 2005). Na riziko ALL vplýva aj to, ktoré v poradí sa dieťa narodilo. Deti, ktoré už majú staršieho súrodenca alebo súrodencov majú vyššiu pravdepodobnosť kontaktu s bežnými detskými infekciami na rozdiel od prvorođených detí. U detí, ktoré sa narodili ako prvé, bola skutočne zistená vyššia incidencia ALL (Dockerty, Draper et al. 2001).

Mechanizmus leukemogenézy na genetickej úrovni sa v súčasnosti vysvetľuje pomocou dvoj- alebo viaczásahového modelu. Pôsobením prvého zásahu, ktorý je relatívne častý, vznikne primárna genetická zmena (napríklad fúzny gén alebo hyperdiploidia). Tento prvý zásah však na vznik leukémie očividne nestačí (Greaves 1999). Okrem myších modelov (Castilla, Wijmenga et al. 1996; Brown, Kogan et al. 1997; Grisolano, Wesselschmidt et al. 1997; He, Tribioli et al. 1997; Rhoades, Hetherington et al. 2000; Yuan, Zhou et al. 2001; de Guzman, Warren et al. 2002; Higuchi, O'Brien et al. 2002; Tsuzuki, Seto et al. 2004) to dokazujú aj štúdie na pupočníkovej krvi zdravých novorodencov. Práce vyšetrujúce fúzny gén TEL/AML1 prítomný skoro u štvrtiny detských pacientov s ALL detekovali túto translokáciu aj

v pupočníkovej krvi 1-3% zdravých novorodencov (Mori, Colman et al. 2002; Madžo, Mužíkova et al. 2003). Frekvencia nálezov fúzneho génu je približne 100x vyššia než je celková kumulatívna pravdepodobnosť, že niektoré z postihnutých detí ochorie na TEL/AML1 pozitívnu leukémiu. Na vznik leukémie je teda potrebná ďalšia mutácia, ktorá však je relatívne vzácna (Greaves 1999).

Vlastný mechanizmus spustenia leukémie však stále nie je známy. Známe sú len niektoré faktory, zvyšujúce riziko leukémií.

Jediným doposiaľ preukázaným rizikovým faktorom podieľajúcim sa na vzniku leukémií je ionizujúce žiarenie. U Japoncov, ktorí prežili v roku 1945 výbuch atómovej bomby, bol pozorovaný zvýšený výskyt leukémií (Preston, Kusumi et al. 1994). Pravdepodobnosť vzniku leukémií stúpa aj u detí, ktorých matky v období tehotenstva absolvovali rádiodiagnostické vyšetrenie (Doll and Wakeford 1997).

Objavili sa aj publikácie hovoriace o súvislosti leukémií s elektromagnetickým žiarením. Tieto práce však nie sú podložené žiadnymi biologickými dôkazmi.

Na vzniku niektorých leukémií sa podieľajú vírusy. Retrovírus HTLV1 (Human T-cell Leukemia Virus) spôsobuje T-ALL, ktorá sa v vyskytuje hlavne u dospelých v južnom Japonsku a Karibiku (Adedayo, Grell et al. 2003). Vírus EBV (Epstein-Barrovej vírus) je pôvodcom Burkittovho lymfómu. Prítomnosť EBV vírusu bola zistená aj u pacientov Hodgkinovým lymfómom, T-bunkovým lymfómom a ďalšími malígnymi ochoreniami (Kawa 2000).

So zvýšeným rizikom leukémie sú asociované niektoré genetické syndrómy. Pacienti s Downovým syndrómom majú vysokú incidenciu AML-M7 (Zipursky, Peeters et al. 1987). Bloomov syndróm, ataxia–teleangiectázia, neurofibromatóza a Schwachmanov syndróm sú ďalšie genetické choroby, pri ktorých je výskyt leukémie častejší (Khanna 2000; Poppe, Van Limbergen et al. 2001; Kratz, Antonietti et al. 2003; Dror 2005; Ziino, Rondelli et al. 2006). Všetky sú však relatívne veľmi vzácne.

Chemických látok, ktoré sú považované za leukemogénne je mnoho. Príkladom takýchto chemikálií sú benzén (hojne využívaný napríklad pri výrobe farbív, liekov, plastov a benzínu), chloramfenikol a fenylbutazón (Sidi, Douer et al. 1978; Shu, Gao et al. 1987).

Aký presný význam majú jednotlivé rizikové faktory pri vzniku leukémie však nie je doposiaľ jasné.



Zaujímavou skupinou leukémií sú sekundárne leukémie. Tieto leukémie vznikajú ako následok terapie primárnej malignity. Jedna veľká skupina týchto leukémií vzniká po liečbe alkylačnými cytostatikami s latenciou 5-7 rokov, prejavuje sa zvyčajne u starších pacientov, a sú pre ňu charakteristické delécie chromozómu 5 a/alebo 7. V druhej veľkej skupine nachádzame aberácie génu MLL iniciované terapiou inhibítormi topoizome- rázy II. Táto skupina sekundárnych leukémií má latenciu 1-2 roky a objavuje sa skôr u mladších pacientov (Dann and Rowe 2001).

### **Prenatálny pôvod detských leukémií**

Je známe, že niektoré typy detských leukémií môžu byť iniciované už počas prenatálneho vývoja. Prvým nepriamym dôkazom boli konkordantné leukémie monozygotných dvojčiat. V ich leukemických bunkách boli pozorované identické genetické zmeny. Bola vyslovená hypotéza, že leukemické bunky vzniknuté v priebehu intrauterinného vývoja u jedného dvojčaťa sa môžu šíriť do krvného obehu druhého dvojčaťa placentárnymi anastomózami (Ford, Pombo-de-Oliveira et al. 1997).

Odpoveď na kľúčovú otázku vzniku leukémie pomáhajú zodpovedať štúdie skúmajúce prítomnosť (pre-)leukemických buniek v archivovanom materiále pred nástu- pom diagnózy leukémie (prehľad vid' (Greaves 2003)). Príkladom takéhoto materiálu sú tzv. Guthrieho kartičky. Guthrieho kartičky sú zaschnuté kvapky krvi odoberané tesne po narodení a štandardne sa používajú na novorodenecký screening metabolických porúch. V Českej republike sú uchovávané po dobu 10 rokov. Guthrieho kartičky sa môžu po odplavení inhibítorov PCR priamo použiť v PCR reakcii, alebo je z nich možné extrahovať DNA. Z archivovaných kartičiek nie je možné získať použiteľnú mRNA, preto si metóda backtrackingu z Guthrieho kartičiek vyžaduje najst' sledovaný znak na DNA úrovni.

Priamy dôkaz prenatálneho pôvodu ALL bol podaný až v roku 1997. Gale et al. spätne detekovali fúzny gén MLL/AF4 v DNA uchovanej na Guthrieho kartičkách u troch detí, ktoré ochoreli vo veku 5, 6 a 24 mesiacov (Gale, Ford et al. 1997). V uvedenej práci zároveň prvýkrát uskutočnili a popísali metódu spätného sledovania leukémie s využitím Guthrieho kartičiek (tzv. leukaemia backtracking).

Pri tejto metóde sa najskôr identifikuje klonálny marker pre leukemické bunky na úrovni genomickej DNA u pacientov s leukémiou v čase diagnózy. Následne sa vyšetruje prítomnosť týchto špecifických zmien z materiálu, ktorý bol odobraný krátko po narodení – z Guthrieho kartičky.

Neskôr ďalší autori pomocou obdobnej metódy dokázali, že prenatálny pôvod je pomerne častý u detí s ALL charakterizovanou fúznym génom TEL/AML1 (ETV6/RUNX) (Ford, Bennett et al. 1998; Maia, Ford et al. 2001; Hjalgrim, Madsen et al. 2002; Greaves, Maia et al. 2003; McHale, Wiemels et al. 2003).

Pretože leukemické lymfoidné blasty pochádzajú z jednej malígne transformovanej bunky, nesie spravidla celý klon zhodné prestavby génov pre imunoglobulíny (Ig) a receptory T-buniek (T-cell receptor, TCR). U viac než 90% detských pacientov s ALL je tak možné tieto klonálne-špecifické prestavby Ig a TCR génov využiť k detekcii a „backtrackingu“ (pre-)leukemických buniek. Identické prestavby Ig/TCR génov boli nájdené u dvojčiat a trojčiat s ALL (Ford, Pombo-de-Oliveira et al. 1997; Maia, van der Velden et al. 2003; Zuna, Muzikova et al. 2003) i v Guthrieho kartičkách nedvojčacích pacientov s touto diagnózou (Yagi, Hibi et al. 2000; Fasching, Panzer et al. 2001; Taub, Konrad et al. 2002).

Zhrnutie dosiaľ publikovaných prác vyšetrujúcich prenatálny pôvod ALL s využitím Guthrieho kartičiek je v tabuľke 2.

V porovnaní s ALL je o prenatálnom pôvode AML podstatne menej informácií. Hlavným dôvodom je nižšia početnosť AML v detskom veku a predovšetkým fakt, že pre heterogénnejšiu skupinu AML sa ťažšie hľadajú klonálne špecifické leukemogénne zmeny sledovateľné na DNA úrovni s dostatočnou citlivosťou. K prestavbám Ig/TCR génov dochádza pri AML relatívne vzácné.

Okrem kojeneckých leukémií, pri ktorých je prenatálny pôvod zrejme pravidlom, bolo popísaných len niekoľko prípadov monozygotných dvojčiat s konkordantnými AML (Richkind, Loew et al. 1998; Greaves, Maia et al. 2003). Leukemické bunky nesúce gén AML1/ETO boli detekované na Guthrieho kartičkách piatich z desiatich pacientov (Wiemels, Xiao et al. 2002) a nedávno boli popísané individuálne prípady pozitívneho nálezu na Guthrieho kartičkách u pacientov s fúznymi génmi PML/RARalfa, CBFbeta/MYH11 a MLL/AF10 (Jones, Neat et al. 2003; McHale, Wiemels et al. 2003).

Zhrnutie dosiaľ publikovaných prác vyšetrujúcich prenatálnu pôvod AML s využitím Guthrieho kartičiek je v tabuľke 3.

V našej štúdií sme zisťovali prípadnú prenatálnu prítomnosť fúzných génov PML/RARalfa, CBFbeta/MYH11, AML1/ETO, interné tandemové duplikácie FLT3 génu a prestavby génu MLL u nekojeneckých pacientov s AML. Uvedené aberácie a prestavby sú vhodnými markermi pre túto analýzu, lebo sú na DNA úrovni klonálne špecifické a vyskytujú sa takmer v polovici prípadov detských AML (Richkind, Loew et al. 1998; Meshinchi, Woods et al. 2001). U pacientov s ALL sme vyšetřovali fúzny gén TEL/AML1 a prestavby Ig a TCR génov. Ich výskyt pri ALL je > 90%.

<b>Tab. 2</b> Zhrnutie doposiaľ publikovaných prác zaoberajúcich sa backtrackingom ALL		
<b>Vek (mesiace)</b>	<b>Guthrieho kartička</b>	<b>Typ leukémie</b>
Marker: t(4;11) (Gale, Ford et al. 1997)		
5	+	t(4;11)
6	+	t(4;11)
24	+	t(4;11)
Marker: t(12;21) (Wiemels, Cazzaniga et al. 1999)		
25	+	t(12;21)
34	+	t(12;21)
39	+	t(12;21)
40	-	t(12;21)
41	-	t(12;21)
42	+	t(12;21)
47	-	t(12;21)
51	+	t(12;21)
61	+	t(12;21)
Marker: IgH/TCR (Fasching, Panzer et al. 2001)		
6	+	t(4;11)
12	+	t(4;11)
25	+	T-ALL
26	+	T-ALL
56	+	BCP-ALL
Marker: IgH/TCR (Yagi, Hibi et al. 2000)		
0,5	+	t(4;11)
2	+	t(4;11)
18	-	BCP-ALL
24	+	BCP-ALL
24	-	BCP-ALL

<b>Tab. 2</b> Zhrnutie doposiaľ publikovaných prác zaoberajúcich sa backtrackingom ALL		
<b>Vek (mesiace)</b>	<b>Guthrieho kartička</b>	<b>Typ leukémie</b>
27	+	BCP-ALL
108	-	BCP-ALL
Marker: IgH (Taub, Konrad et al. 2002)		
18	+	BCP-ALL
25	+	BCP-ALL
27	+	BCP-ALL
30	-	BCP-ALL
33	+	BCP-ALL
34	+	BCP-ALL
35	+	t(12;21)
42	+	BCP-ALL
46	-	BCP-ALL
48	-	BCP-ALL
48	-	BCP-ALL
60	+	BCP-ALL
96	+	BCP-ALL
108	+	BCP-ALL
108	-	BCP-ALL
120	+	t(4;11)
156	+	BCP-ALL
Marker: t(12;21) (Hjalgrim, Madsen et al. 2002)		
35	+	t(12;21)
39	-	t(12;21)
40	+	t(12;21)
41	-	t(12;21)
47	-	t(12;21)
50	-	t(12;21)
66	-	t(12;21)
68	+	t(12;21)
74	-	t(12;21)
Marker: t(1;19) (Wiemels, Leonard et al. 2002)		
20	-	t(1;19)
20	-	t(1;19)
27	-	t(1;19)
29	-	t(1;19)
51	-	t(1;19)
61	-	t(1;19)
63	+	t(1;19)
78	-	t(1;19)
81	-	t(1;19)
87	-	t(1;19)
90	-	t(1;19)

<b>Tab. 2</b> Zhrnutie doposiaľ publikovaných prác zaoberajúcich sa backtrackingom ALL		
<b>Vek (mesiace)</b>	<b>Guthrieho kartička</b>	<b>Typ leukémie</b>
98	-	t(1;19)
103	+	t(1;19)
134	-	t(1;19)
149	-	t(1;19)
Marker: t(12;21) (McHale, Wiemels et al. 2003)		
26	-	t(12;21)
27	+	t(12;21)
28	-	t(12;21)
30	-	t(12;21)
33	+	t(12;21)
34	+	t(12;21)
38	-	t(12;21)
42	+	t(12;21)
48	+	t(12;21)
51	+	t(12;21)
55	-	t(12;21)
56	-	t(12;21)
56	-	t(12;21)
80	+	t(12;21)

<b>Tab. 3</b> Zhrnutie doposiaľ publikovaných prác zaoberajúcich sa backtrackingom AML		
<b>Vek (mesiace)</b>	<b>Guthrieho kartička</b>	<b>Typ leukémie</b>
Marker: t(8;21) (Wiemels, Xiao et al. 2002)		
42	+	t(8;21)
47	+	t(8;21)
59	-	t(8;21)
62	-	t(8;21)
75	+	t(8;21)
93	-	t(8;21)
103	-	t(8;21)
120	-	t(8;21)
121	+	t(8;21)
146	+	t(8;21)
Marker: t(15;17) a inv(16) (McHale, Wiemels et al. 2003)		
127	+	t(15;17)
neuveđený	-	t(15;17)
112	+	inv(16)
neuveđený	-	inv(16)
Marker: t(10;11) (Jones, Neat et al. 2003)		
24	+	t(10;11)

## **Charakteristika a backtracking sekundárnych leukémií spojených s translokáciami génu MLL**

Sekundárne leukémie sú jedným z najzávažnejších neskorých následkov liečby nádorových ochorení. Objavujú sa napríklad po liečbe rakoviny prsníka, detských leukémií a Hodgkinovských a non-Hodgkinovských lymfómov (Leone, Mele et al. 1999; Carli, Sgro et al. 2000; Micallef, Lillington et al. 2000). Ako už bolo spomenuté v kapitole o etiológii leukémií, ich vzniku najčastejšie predchádza liečba alkylačnými cytostatikami alebo inhibítormi topoizomerázy II (etopozid, tenipozid, doxorubicín, daunorubicín) (Dann and Rowe 2001).

Akumulácia zlomov spôsobených inhibíciou topoizomerázy II spolu s narušenými reparačnými mechanizmami môže vyvolať vznik chromozomálnych translokácií MLL génu. Na rozdiel od de novo MLL asociovaných leukémií, pri ktorých dochádza k zlomu prevažne v centromerickej oblasti bcr („Breakpoint Cluster Region“), pri sekundárnych leukémiách sa zlomové miesto nachádza v telomerickej oblasti bcr génu MLL, kde je väčšina väzobných miest topoizomerázy II (Broeker, Super et al. 1996).

V našej práci sme sa zaoberali backtrackingom sekundárnej ALL charakterizovanej fúznym génom MLL/FOXO3A. Pri sekundárnych leukémiách nám väčšia dostupnosť materiálu pred nástupom diagnózy (v porovnaní s de-novo ochoreniami, kde máme k dispozícii spravidla iba Guthrieho kartičky) umožňuje lepšie odsledovať kinetiku choroby.

Doteraz boli publikované 4 práce skúmajúce backtracking sekundárnych leukémií. Vo všetkých prípadoch sa jednalo o pacientov so sekundárnou AML, ktorí mali v leukemických bunkách prestavbu MLL génu (Megonigal, Cheung et al. 2000; Blanco, Dervieux et al. 2001; Metzler, Strissel et al. 2004; Ng, Ravetto et al. 2004).

Prvýkrát sa sledovaním (pre-)leukemických buniek vo svojej práci zaoberali Megonigal et. al, ktorí odhalili bunky s translokáciou t(11,17) 12 mesiacov po iniciálnej diagnóze neuroblastómu. Fúzny gén MLL/GAS7 bol detekovateľný 1,5 mesiaca od začiatku liečby neuroblastómu. Liečba pozostávala z nízkych kumulatívnych dávok cyklofosfamidu, doxorubicínu, vinkristínu, etopozidu a cisplatiny (Megonigal, Cheung et al. 2000).

Druhá publikácia popisuje pacienta s hyperdiploidnou ALL, u ktorého bola po 23 mesiacoch od začiatku liečby primárnej diagnózy diagnostikovaná sekundárna AML charakterizovaná translokáciou t(11,19). Fúzny gén MLL/ENL bol prítomný v kostnej dreni už 6 mesiacov po diagnóze hyperdiploidnej ALL, ktorej liečba obsahovala aj jednu dávku daunorubicínu a dve dávky etopozidu. V periférnej krvi sa MLL/ENL pozitívne bunky objavili po 16 mesiacoch od začiatku liečby primárnej malignity (Blanco, Dervieux et al. 2001).

V tretej publikácii nemeckí autori spätne vyšetřovali vzorky kostnej drene od dvoch pacientov so sekundárnou AML s fúznym génom MLL/AF9. U oboch pacientov bola pôvodná diagnóza ALL z prekursorov B buniek. Pomocou real-time kvantitatívnej reverzne transkriptázovej PCR (RQ-RT-PCR) bola stanovená prítomnosť MLL/AF9 translokácie u prvej pacientky 6 mesiacov pred diagnózou sekundárnej AML. U druhého pacienta bol fúzny gén MLL/AF9 zistený 12 mesiacov pred stanovením diagnózy sekundárnej AML (Metzler, Strissel et al. 2004).

V štvrtom článku Ng et al. detekovali zlom v géne MLL pomocou Southern blotu 3 mesiace pred nástupom diagnózy sekundárnej AML, diagnostikovanej po liečbe hemofagocytárnej lymfohistiocytózy (Ng, Ravetto et al. 2004).

Nedávno bola publikovaná zaujímavá práca popisujúca prípad pacientky, ktorá mala napriek absencii príznakov leukémie v kostnej dreni pomerne vysoké percento buniek s prestavbou MLL génu. Vo veku 5 rokov jej bola diagnostikovaná AML s fúznym génom AML1/ETO. Pacientka po terapii dosiahla remisiu. Avšak kontrolné vyšetřenie kostnej drene odhalilo po 15 mesiacoch od začiatku terapie fúzny gén MLL/ARHGEF17. Vzorky kostnej drene boli sledované počas nasledujúcich 30 mesiacov. Počas tohto obdobia kolísal počet MLL/ARHGEF17 pozitívnych buniek medzi 20-50%. Morfologické vyšetřenia však neodhalili žiadne známky malignity. Autori analyzovali morfológiu buniek s MLL/ARHGEF17 translokáciou a zistili, že je prítomná v rôznych bunkách myeloidnej línie. MLL/ARHGEF17 teda vznikla vo včasnom myeloidnom progenitore avšak táto translokácia nespôsobila blok v myeloidnej diferenciácii. Doba sledovania spomínanej pacientky bola krátka a autori tejto práce nevyklučujú, že uvedená translokácia prispieva k leukemogénze v spolupráci s ďalšou mutáciou (Teuffel, Betts et al. 2005).

## Charakteristika vyšetovaných markerov

### Tandemová duplikácia génu FLT3

Tandemové duplikácie génu FLT3 (FLT3 internal tandem duplication, FLT3/ITD) sú prítomné v približne 17% detských akútnych myeloidných leukémií (Meshinchi, Woods et al. 2001).

Na súvislosť FLT3/ITD a AML prvýkrát poukázali Nakao et al. v roku 1996. U 5 z 30 pacientov s AML pozorovali neočakávane dlhší produkt FLT3 génu a sekvenčná analýza aberantného FLT3 produktu u nich odhalila tandemovú duplikáciu. Duplikácie génu FLT3 sa u jednotlivých pacientov líšili dĺžkou a pozíciou, avšak boli vždy v čítacom rámci (Nakao, Yokota et al. 1996). Tieto pozorovania potvrdilo množstvo ďalších prác, v ktorých autori zistili u dospelých pacientov s AML podobné výsledky frekvencie tandemovej duplikácie génu FLT3 (Kottaridis, Gale et al. 2001; Shih, Huang et al. 2002). Duplikácie FLT3 génu sú časté aj u detských pacientov s AML. Zaujímavé je, že sa jedná vo veľkej miere o staršie deti (Kondo, Horibe et al. 1999; Liang, Shih et al. 2002; Zwaan, Meshinchi et al. 2003). Okrem pacientov s akútnymi myeloidnými leukémiami boli FLT3/ITD nájdené aj u pacientov s myelodysplastickým syndrómom (MDS) (Yokota, Kiyoi et al. 1997; Yamamoto, Kiyoi et al. 2001; Shih, Lin et al. 2004; Wang, Lin et al. 2005) a pomerne vzácne u pacientov s akútnymi lymfoblastickými leukémiami (Xu, Taki et al. 1999; Yamamoto, Isomura et al. 2006).

Gén FLT3 je lokalizovaný na chromozóme 13 v oblasti q12 (Rosnet, Stephenson et al. 1993), je tvorený 24 exónmi (Abu-Duhier, Goodeve et al. 2001) a kóduje tyrozín-kinázový receptor triedy III. Receptory tejto rodiny sú charakterizované piatimi imunoglobulínovými doménami, transmembránovou doménou, juxtamembránovou doménou a dvomi tyrozínkinázovými doménami. Okrem génu FLT3 patria do tejto rodiny aj gény FMS, PDGF a KIT (Matthews, Jordan et al. 1991). FLT3 gén je u zdravých jedincov exprimovaný na lymfoidných a myeloidných hematopoetických progenitoroch a ovplyvňuje proliferáciu a diferenciáciu hematopoetických buniek (Lyman and Jacobsen 1998).



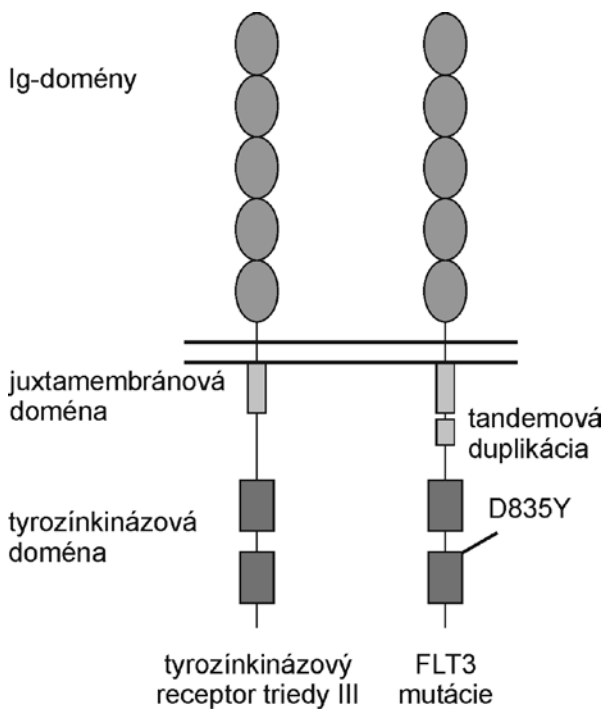
Pri tandemovej duplikácii génu FLT3 dochádza ku konštitutívnej aktivácii tyrozínkinázy FLT3 (obr. 1). To má za následok autonómnú proliferáciu buniek (Hayakawa, Towatari et al. 2000; Scheijen, Ngo et al. 2004; Chen, Levis et al. 2005) a blok v diferenciácii (Zheng, Friedman et al. 2004) a apoptóze (Kim, Baird et al. 2005; Yang, Liu et al. 2005).

Tandemová duplikácia génu FLT3 je obvykle spájaná s nepriaznivou prognózou (Kottaridis, Gale et al. 2001; Meshinchi, Woods et al. 2001; Zwaan, Meshinchi et al. 2003; Kang, Hong et al. 2005).

Pomerne častý výskyt tejto mutácie predpokladal jej použitie na monitorovanie minimálnej reziduálnej nemoci (MRN) (Schnittger, Schoch et al. 2002). Neskôr sa však ukázalo, že tandemová duplikácia génu FLT3 nemusí byť stabilná počas priebehu ochorenia a jej využitie ako markeru na sledovanie MRN bolo spochybnené (Kottaridis, Gale et al. 2002; Shih, Huang et al. 2002).

Častý výskyt FLT3/ITD a nepriaznivá prognóza pacientov s touto mutáciou logicky viedla k hľadaniu inhibítorov patologicky aktivovanej kinázy FLT3. Inhibítory AG1296 a SU11248 sú schopné inhibovať rast buniek transformovaných FLT3/ITD (Tse, Novelli et al. 2001; O'Farrell, Abrams et al. 2003). Nádejný liek u pacientov s AML by mohol byť tyrozínkinázový inhibítor CEP-701, selektívne inhibujúci autofosforyláciu FLT3 (Smith, Levis et al. 2004).

Okrem tandemovej duplikácie génu FLT3 bol pri hematologických malignitách pozorovaný aj výskyt missense mutácie D835Y v aktivačnej doméne génu FLT3 vyskytujúcej sa približne u 7% pacientov s AML. Pri spomínanej mutácii dochádza v pozícii 835 k zámene asparagínu za tyrozín. Substitúcia Asp835Tyr je najbežnejšia, boli však pozorované aj zriedkavejšie substitúcie (Asp835Val, Asp835His, Asp835Glu a Asp835Asn) (obrázok 1). Podobne ako tandemová duplikácia FLT3, tak aj mutácie v pozícii D835 spôsobujú ligand-nezávislú konštitutívnu autofosforyláciu (Yamamoto, Kiyoi et al. 2001).



**Obr. 1** Mutácie génu FLT3

## Translokácia AML1/ETO

Fúzny gén AML1/ETO (RUNX1/CBFA2T1) sa vyskytuje približne u 12% pacientov s akútnou myeloidnou leukémiou (Raimondi, Chang et al. 1999). Väčšinu týchto prípadov predstavujú akútne myeloidné leukémie typu M2 (Langabeer, Walker et al. 1997). Pacienti s translokáciou  $t(8;21)(q22;q22)$  majú zvyčajne priaznivú prognózu (Grimwade, Walker et al. 1998).

Translokácia AML1/ETO je výsledkom spojenia génu AML1 lokalizovaného na chromozóme 21 s génom ETO ležiacim na chromozóme 8 (Nucifora, Birn et al. 1993). Gén AML1 (RUNX1, PEBP2AB) kóduje transkripčný faktor, ktorý spolu s CBFbeta formuje heterodimerický transkripčný faktor CBF („core binding factor“) reguláciou expresiu veľkého množstva génov zahrnutých v hematopoéze (Ichikawa, Asai et al. 2004; Growney, Shigematsu et al. 2005). Gén AML1 spolu s génom ETO boli prvýkrát klonované ako časti chromozómov 21 a 8 podieľajúcich sa na translokácii  $t(8;21)(q22;q22)$  (Miyoshi, Shimizu et al. 1991).

Gén AML1 je okrem akútnych myeloidných leukémií asociovaný aj s chromozomálnymi translokáciami pri B-prekurzorových detských leukémiách. TEL/AML1 je najčastejšou nenáhodnou chromozomálnou translokáciou pri detských akútnych lymfoblastických leukémiách (ALL) a vyskytuje sa približne u 20-25% pacientov s ALL (Romana, Mauchauffe et al. 1995; Shurtleff, Buijs et al. 1995; Borkhardt, Cazzaniga et al. 1997; Zuna, Hrusak et al. 1999). Významná je aj abnormalita postihujúca beta podjednotku transkripčného faktoru CBF. CBFbeta je alternovaný v inverzii chromozómu 16(p13q22) pri akútnej myeloidnej leukémii typu M4Eo (Liu, Tarle et al. 1993).

Gén AML1 obsahuje doménu, ktorá je vysoko homológna so segmentačným génom *runt* u drozofily (Erickson, Gao et al. 1992; Meyers, Downing et al. 1993) a viaže sa na DNA sekvenciu TGT/CGGT (Erickson, Gao et al. 1992). Runt doména génu AML1 sa viaže okrem DNA aj na CBFbeta podjednotku CBF (Meyers, Downing et al. 1993). Pokusy s knock-out myšami potvrdili kľúčovú úlohu génu AML1 pre hematopoézu. U myší bez proteínu AML1 bola demonštrovaná absencia hematopoetických progenitorov a myšie embryá v 12 dni umierali s absenciou fetálnej krvotvorby (Okuda, van Deursen et al. 1996).

Gén ETO obsahuje 4 oblasti ktoré sú homologické s génom *nervy* u drozofily. Do rodiny génov ETO patria aj gény MTGR1 a MTG16 (Davis, McGhee et al. 2003). MTG16 gén bol detekovaný ako súčasť fúzneho génu AML1/MTG16, čo je pomerne vzácna translokácia a bola objavená u pacientov so sekundárnou AML a MDS (Gamou, Kitamura et al. 1998).

Produkt fúzneho génu AML1/ETO obsahuje N-terminálnu časť proteínu AML1 s runt doménou a C-terminálnu časť proteínu ETO. ETO oblasť interaguje s korepresormi N-CoR a mSin3, ktoré sa viažu s histón-deacetylázami triedy I (HDACs) (Lutterbach, Westendorf et al. 1998; Heibert, Lutterbach et al. 2001). AML1/ETO teda zrejme prostredníctvom interakcie s HDACs reprimuje expresiu génov, ktoré sú za fyziologických podmienok transaktivované proteínom AML1 (Lutterbach, Westendorf et al. 1998; Wang, Hoshino et al. 1998).

Fúzny gén AML1/ETO je schopný immortalizovať bunkové línie (Frank, Sun et al. 1999) a zvýšiť samoobnovovaciu kapacitu hematopoetických kmeňových buniek (Mulloy, Cammenga et al. 2002; Mulloy, Cammenga et al. 2003). V kondicionálnych

myších modeloch s AML1/ETO translokáciou sa však leukémia nevyvinula (Rhoades, Hetherington et al. 2000; Yuan, Zhou et al. 2001; de Guzman, Warren et al. 2002; Higuchi, O'Brien et al. 2002). Samotný fúzny gén AML1/ETO teda na vznik leukémie pravdepodobne nestačí. Potvrdzujú to aj štúdie u pacientov s t(8;21). Schessl et al. vyšetrovali leukemické bunky u pacientov s AML charakterizovanou fúznym génom AML1/ETO na prítomnosť mutácií v génoch FLT3, KIT a RAS. Došli k zaujímavému zisteniu. U skúmaných pacientov pozorovali pomerne častý výskyt spomínaných aberácií (Schessl, Rawat et al. 2005). Analýzu mutácií v génoch KIT a FLT3 u pacientov s t(8;21) nedávno publikovali aj japonskí autori (Shimada, Taki et al. 2006). Tieto práce ukazujú, že samotná prítomnosť fúzneho génu AML1/ETO pravdepodobne k malígnej transformácii nestačí.

### **Fúzny gén CBFbeta/MYH11**

CBFbeta/MYH11 pozitívne leukémie tvoria približne 6% detských akútnych myeloidných leukémií (Raimondi, Chang et al. 1999).

Ako už bolo uvedené v časti o AML1/ETO translokácii, CBFbeta podjednotka transkripčného faktoru CBF býva porušená pri abnormalitách chromozómu 16 (Liu, Tarle et al. 1993).

CBFbeta/MYH11, pri ktorom fúzuje gén CBFbeta s génom kódujúcim ťažký myozínový reťazec, vzniká okrem inverzie chromozómu 16 v zriedkavejších prípadoch aj translokáciou t(16;16)(p13;q22). Fúzny gén CBFbeta/MYH11 je spojený prevažne so subtypom AML-M4 Eo, charakterizovaným prítomnosťou atypických eozinofilov a relatívne dobrou prognózou (Rubnitz and Look 1998). Okrem AML-M4 Eo bola táto fúzia popísaná aj u pacientov s AML typu M1, M4, sekundárnou AML a u pacientov s MDS (Tobal, Johnson et al. 1995; Usuki, Nakatsu et al. 1996). Chimerický proteín CBFbeta/MYH11 pozostáva z N-terminálnej časti CBFbeta fúzovanej s C-terminálnou časťou MYH11. Pokusy na knock-in myších modeloch ukázali, že u CBFbeta/MYH11 pozitívnych zvierat dochádzalo k poškodeniu definitívnej hematopoézy a hemoragiám. Myši umierali ešte v embryonálnom období do 2 týždňov. Expresia CBFbeta/MYH11 u nich indukovala predispozíciu k morfológickým príznakom podobným AML-M4Eo, avšak samotná translokácia na vznik AML nestačila (Castilla, Wijmenga et al. 1996).

Myší model na štúdium biológie CBFbeta/MYH11 použila aj skupina amerických autorov, ktorá sa zaujímala o jeho efekt na myelopoézu. Študované transgénne myši exprimovali chimerický fúzny proteín v myeloidných bunkách a v ich kostnej dreni bolo pozorované zvýšené množstvo abnormálnych nezrelých neutrofilov. Uvedený chimerický proteín viedol aj k inhibícii diferenciácie neutrofilov (Kogan, Lagasse et al. 1998).

Mechanizmus supresie diferenciácie granulocytov v CBFbeta/MYH11 pozitívnych bunkách poodhalili vo svojej štúdii švajčiarski autori. Ich práca uvádza, že CBFbeta/MYH11 tlmí diferenciáciu granulocytov supresiou myeloidného transkripčného faktora CEBPA (CCAAT/enhancer-binding protein alpha), ktorý je kľúčovým faktorom v granulopoéze (Helbling, Mueller et al. 2005).

CBFbeta/MYH11 ovplyvňuje dominante negatívnym mechanizmom funkciu transkripčného faktora CBF, ktorý reguluje expresiu génov špecifických pre hematopoézu. Tento chimerický proteín sa viaže na AML1 s vyššou afinitou v porovnaní s nemutovaným proteínom CBFbeta a inaktivuje jeho funkciu (Huang, Shigesada et al. 2004).

Faktorom prispievajúcim k leukemogéze by mohla byť aj redukcia apoptózy. V myšej bunkovej línii Ba/F3 viedol transfekovaný CBFbeta/MYH11 fúzny gén ku zníženiu expisie p53 génu. V týchto bunkách bola po ožiarení ionizujúcim žiarením alebo po pôsobení etopozidu pozorovaná inhibícia apoptózy v porovnaní s netransfekovanými bunkami (Britos-Bray, Ramirez et al. 1998).

Pri CBFbeta/MYH11 pozitívnych leukémiách môže spolupôsobiť aj hypermetylácia promótoru génu RARA2, ktorá sa pri nich pomerne často vyskytuje. Utlmenie prepisu tohto potenciálneho tumor-supresorového génu metyláciou bolo popísané aj pri niektorých solídnych nádoroch (Rethmeier, Aggerholm et al. 2006).

## **Translokácia PML/RARalfa**

Akútna promyelocytárna leukémia (APL, AML-M3) je charakterizovaná klonálnou expanziou malígnych myeloidných prekursorov zastavených v štádiu promyelocytu. Vo väčšine prípadov je v leukemických promyelocytoch prítomný fúzny gén PML/RARalfa. Táto translokácia je výsledkom fúzie génu PML lokalizovaného na chromozóme 15 a génu RARalfa kódujúceho receptor pre retinovú kyselinu (ATRA)

(Borrow, Goddard et al. 1990; de The, Chomienne et al. 1990; Alcalay, Zangrilli et al. 1991; Kakizuka, Miller et al. 1991).

Menej častými fúznymi partnermi génu RARalfa pri akútnej promyelocytárnej leukémii sú gény PLZF (transkripčný faktor s motívom zinkových prstov) (Chen, Brand et al. 1993), NuMA (proteín mitotického aparátu) (Wells, Catzavelos et al. 1997), nukleofosfín (Redner, Rush et al. 1996) a STAT5b (Arnould, Philippe et al. 1999). PML/RARalfa pozitívne leukémie tvoria približne 6% detských akútnych myeloidných leukémií (Raimondi, Chang et al. 1999).

Gén RARalfa kóduje proteín, ktorý je členom rodiny jadrových hormonálnych receptorov (Mangelsdorf and Evans 1995). Reguluje expresiu mnohých génov uplatňujúcich sa v myelopoéze (Chambon 1996). V neprítomnosti kyseliny retinovej sa RARalfa viaže spolu s RXR receptorom ako heterodimér na špecifické DNA sekvencie cieľových génov (RARE sekvencie – retinoic acid response elements) a potláča ich transkripciu prostredníctvom interakcie s nukleárnymi korepresormi mSin3A a N-CoR a histón deacetylázovým komplexom (HDAC) (Minucci and Pelicci 1999; Xu, Glass et al. 1999). Pridanie kyseliny retinovej vedie k uvoľneniu represorového komplexu a následnej asociácii s transkripčnými koaktivátormi vrátane histónacetyláz (Lee, Lee et al. 2001).

Gén PML kóduje proteín, ktorý je v bunkách lokalizovaný v tzv. PML jadrových telieskach, ktoré sa zúčastňujú zásadných procesov ako je regulácia bunkového cyklu, reparácia DNA udržiavanie stability genómu, antivírusová ochrana bunky a apoptóza.

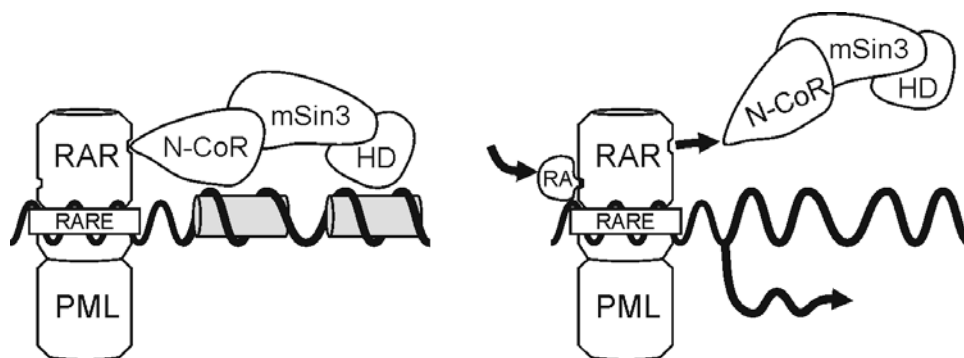
Na bunku pripadá približne 10-30 PML jadrových teliesok (Melnick and Licht 1999), spolu s PML sa v nich vyskytujú aj proteíny BLM, CBP, SUMO-1, p53, NBS1, TRF1, TRF2, Mdm2 a mnohé ďalšie (Ching, Dellaire et al. 2005). Tumor supresorový gén PML má dôležitú úlohu v kontrole apoptózy, proliferácie a starnutí buniek (Salomoni and Pandolfi 2002).

Chimerický proteín PML/RARalfa podobne ako nemutovaný proteín RARalfa interaguje s korepresorovým komplexom. Korepresorový komplex spolu s histón-deacetylázami však nedisociuje pri fyziologických dávkach kyseliny retinovej (Grignani, De Matteis et al. 1998; He, Guidez et al. 1998; Lin, Nagy et al. 1998). Na rozdiel od nemutovanej formy RARalfa proteínu sa PML/RARalfa fúzny proteín spája s DNA

metyltransferázami, ktoré prispievajú k supresii génovej expresie (Di Croce, Raker et al. 2002).

Vysoká dávka all-trans retinovej kyseliny (ATRA) je schopná zmeniť transkripčný represor na transkripčný aktivátor uvoľnením represorového komplexu a naviazaním koaktivátorového komplexu. Prítomnosť vysokej hladiny retinovej kyseliny spôsobuje aj degradáciu PML/RARalfa proteínu ubiquitín-proteazómovovou dráhou. Zistenie, že ATRA indukuje diferenciáciu leukemických buniek, spôsobilo zásadný obrat v liečbe APL (Huang, Ye et al. 1988). Tento typ leukémie, ktorý sa v minulosti vyznačoval pomerne vysokou úmrtnosťou, sa tak stal jedným z najlepšie liečiteľných spomedzi všetkých typov akútnych myeloidných leukémií (Tallman, Nabhan et al. 2002).

PML/RARalfa fúzny proteín (obr. 2) interferuje s normálnou funkciou PML aj RARalfa (Melnick and Licht 1999). Uvedený fúzny gén je schopný blokovat' diferenciáciu v bunkových líniiach. Talianski autori pripravili leukemickú prekursorovú myeloidnú líniu s PML/RARalfa fúznym génom a v skúmaných bunkách pozorovali inhibíciu diferenciácie (Grignani, Ferrucci et al. 1993). V myších modeloch sa zvýšila lymfoproliferácia u všetkých PML/RARalfa transgénnych myší. K plnému rozvinutiu akútnej leukémie podobnej akútnej promyelocytárnej leukémii u človeka však došlo len u niektorých myší po dlhej dobe latencie a je tu teda pravdepodobne nutná ďalšia genetická zmena (Brown, Kogan et al. 1997; Grisolano, Wesselschmidt et al. 1997; He, Tribioli et al. 1997).



**Obr. 2** PML/RARalfa fúzny proteín

## Prestavby MLL génu

Abnormality MLL (ALL1, HRX, TRX) génu sa vyskytujú pri akútnych leukémiách detí (Sorensen, Chen et al. 1994; Martinez-Climent, Thirman et al. 1995; Satake, Maseki et al. 1999) a dospelých (Stock, Thirman et al. 1994; del Mar Bellido and Nomdedeu 1999; Cox, Panetta et al. 2004), a časté sú aj pri sekundárnych leukémiách nasledujúcich po liečbe inhibítormi topoizomerázy II (Super, McCabe et al. 1993; Andersen, Christiansen et al. 2001).

Prognóza MLL asociovaných leukémií je zvyčajne zlá (Cimino, Rapanotti et al. 1998; Dimartino and Cleary 1999).

MLL gén je lokalizovaný v oblasti 11q23. Tento gén pozostáva z 36 exónov a kóduje obrovský proteín zložený z 3969 aminokyselín o veľkosti približne 430 kDa. MLL je homológom transkripčného regulátora trithorax u drozofily (Ziemin-van der Poel, McCabe et al. 1991; Gu, Nakamura et al. 1992; Tkachuk, Kohler et al. 1992) a podobne ako u drozofily tak aj u človeka je kľúčovým regulátorom expresie HOX génov (Yu, Hess et al. 1995; Yu, Hanson et al. 1998). Myši s poruchou MLL génu majú zmenenú expresiu HOX génov a trpia vážnymi defektami hematopoézy (Yu, Hess et al. 1995; Hess, Yu et al. 1997; Yagi, Deguchi et al. 1998; Ernst, Fisher et al. 2004).

Od N-konca sa MLL-proteín skladá z troch AT väzobných motívov, domény homologickej s DNA metyltransferázou, PHD domény s motívom zinkových prstov a SET domény. MLL proteín je proteolyticky štiepený Taspázou-I do N-terminálneho 320 kDa veľkého fragmentu (MLL<sup>N</sup>) a C-terminálneho fragmentu s veľkosťou 180 kDa (MLL<sup>C</sup>) (Hsieh, Ernst et al. 2003; Hsieh, Cheng et al. 2003; Yokoyama, Wang et al. 2004).

V súčasnosti je známych viac ako 80 rôznych MLL prestavieb, z ktorých je viac ako 50 partnerských lokusov charakterizovaných molekulárne. MLL/AF4, MLL/AF9, MLL/ENL a MLL/AF10 patria medzi najčastejšie translokácie postihujúce MLL gén. Napriek rozmanitosti fúzných partnerov si MLL gén v translokáciách zachováva N-terminálnu časť obsahujúcu AT väzobné motívy a doménu homologickú s metyltransferázou (Meyer, Schneider et al. 2006).



K zlomu v MLL géne dochádza oblasti dlhej 8.3 kb nachádzajúcej sa medzi exónmi 5 a 11, ktorá býva označovaná ako bcr (Breakpoint Cluster Region) (Gu, Alder et al. 1994). K určeniu neznámeho fúzneho partnera MLL génu je možné použiť metódu long-distance inverznej PCR, ktorá bola popísaná nedávno. Táto metóda tak umožňuje detekovať dosiaľ nepopísané translokácie uvedeného génu (Meyer, Schneider et al. 2005).

V našej práci sme vyšetrovali prenatálny pôvod u troch pacientov s MLL translokáciou (MLL/AF10, MLL/AF9 a MLL/AF6) a robili „backtracking“ fúzneho génu MLL/FOXO3A.

AF10 (MLLT10) gén bol prvýkrát popísaný ako súčasť translokácie t(10;11) (p12;q23), ktorá sa vyskytuje prevažne u pacientov s akútnymi myeloidnými leukémiami. Tento fúzny gén kóduje proteín s veľkosťou 109 kDa zložený z 1027 aminokyselín a obsahujúci N-terminálnu doménu s motívom zinkových prstov a C-terminálnu doménu s motívom leucínového zipu. Spolu s proteínom CEZF u *Caenorhabditis elegans* a ľudským proteínom BR140 patria do spoločnej evolučne konzervovanej rodiny proteínov (Chaplin, Ayton et al. 1995).

Translokácia MLL/AF10 spája N-terminálnu časť MLL génu s C-terminálnou časťou AF10 génu. Tento fúzny gén bol schopný transformovať myšie myeloidné progenitory. K transformácii bola potrebná doména s motívom leucínového zipu. U myší, do ktorých boli transdukované MLL/AF10 pozitívne bunky došlo ku vzniku leukémie po 60-100 dňoch latencie. Na úplné rozvinutie leukémie je teda pravdepodobne potrebný druhý zásah (DiMartino, Ayton et al. 2002).

Nedávno bol popísaný prípad pacienta u ktorého boli MLL/AF10 pozitívne bunky detekované na Guthrieho kartičke (Jones, Neat et al. 2003).

AF9 (LTG9, MLLT3) gén lokalizovaný v oblasti 9p22 je fúznym partnerom MLL génu v translokácii t(9;11) (Iida, Seto et al. 1993). Sekvencia kódujúca 90 C-terminálnych aminokyselín AF9 proteínu je homologická so sekvenciou lokalizovanou v géne ENL, ktorý je rovnako ako AF9 gén častým fúznym partnerom MLL génu (Rubnitz, Morrissey et al. 1994).

Štúdie s MLL/AF9 knock-in myšami ukazujú, že aj vznik tejto leukémie je viacstupňový proces. Hematopoetické bunky získané z fetálnej pečene týchto myší

nemali zvýšenú samoobnovovaciu kapacitu. Tá bola zvýšená až v bunkách získaných z kostnej drene myší po narodení (Johnson, Chen et al. 2003).

AF6 (MLLT4) bol podobne ako AF10 prvýkrát popísaný ako súčasť MLL translokácie. Tento gén je exprimovaný v rôznych typoch buniek a kóduje multi-doménový proteín zložený z 1612 aminokyselín (Prasad, Gu et al. 1993), ktorý spája membránovo viazané proteíny s aktívnym cytoskeletom (Boettner, Govek et al. 2000). Význam spomínaného génu pre vývoj bol dokázaný u AF6 deficientných myší. Myši umierali embryonálne v 10 dni v dôsledku poruchy v medzibunkovom kontakte a neuro-epiteliálne bunky mali redukovanú polaritu (Zhadanov, Provance et al. 1999).

Gén FOXO3A (FKHRL1) je lokalizovaný v oblasti chromozómu 6q21 (Hillion, Le Coniat et al. 1997) a kóduje transkripčný faktor patriaci do obrovskej rodiny tzv. Fork-head proteínov.

FOXO proteíny sú v odpovedi na bunkový podnet alebo inzulín priamymi substrátmi proteín-kinázy Akt. Po naviazaní ligandov na príslušné tyrozínkinázy Akt kináza fosforyluje transkripčné faktory FOXO. Výsledkom tejto fosforylácie je delokalizácia FOXO proteínov z jadra do cytoplazmy a ich degradácia ubiquitín-proteazómovým systémom.

Pri absencii rastových faktorov sú transkripčné faktory FOXO lokalizované v jadre a regulujú gény potrebné na zastavenie bunkového cyklu, apoptózu a na rezistenciu voči stresu (Greer and Brunet 2005).

MLL/FOXO3A je vzácna translokácia, doteraz boli popísané len dva prípady. V oboch sa jednalo o pacientov so sekundárnou AML, ktorí boli predtým liečení na Hodgkinovu chorobu (Hillion, Le Coniat et al. 1997; Bernard, Hillion et al. 1998).

U myší translokácia MLL/FOXO3A zvyšuje samoobnovovaciu kapacitu myeloidných progenitorov. Po niekoľkých mesiacoch od injekcie MLL/FOXO3A pozitívnych buniek bol u nich pozorovaný vznik AML (So and Cleary 2003).

## Ciele

### **Etiológia primárnych leukémií - analýza prenatálneho pôvodu**

- Nájsť klonálny marker pre leukemické bunky u pacientov s ALL a AML starších ako 1 rok pri diagnóze ochorenia.
- Navrhnuť pacient-špecifické primery pre jednotlivé markery a optimalizovať PCR systémy s dostatočnou citlivosťou, aby bolo možné zachytiť minimum buniek na Guthrieho kartičkách.
- Vyšetriť novorodenecký materiál od pacientov (Guthrieho kartičky) a pokúsiť sa detekovať v ňom na DNA úrovni leukemo-špecifické zmeny.

### **Etiológia sekundárnej leukémie**

- Nájsť klonálne markery pre leukemické bunky pacientky s primárnou diagnózou (AML) a následnou diagnózou sekundárnej leukémie (ALL).
- Analyzovať vzorky v rôznych časových bodoch pred nástupom diagnózy sekundárnej leukémie na prítomnosť jednotlivých markerov a odhaliť dynamiku a postupnosť udalostí pred diagnózou sekundárnej leukémie.

## **Metodika**

Jednotlivé metódy používané v laboratórnej práci i pri získavaní a analýze dát sú podrobne popísané i s príslušnými odkazmi v priložených publikáciach.

## **Pacienti a kontroly**

Vyšetrili sme vzorky kostnej drene odobrané pri diagnóze/relapse ochorenia u 13 pacientov s diagnózou AML a u 12 pacientov s diagnózou ALL. Následne sme analyzovali Guthrieho kartičky príslušných detí po získaní informovaného súhlasu od rodičov. Ku každej Guthrieho kartičke pacienta s akútnou leukémiou bola ako negatívna kontrola vyšetrená aj kartička rovnako starého dieťaťa skladovaná v rovnakých podmienkach.

U pacientky so sekundárnou leukémiou sme hľadali markery špecifické pre leukemické bunky vo vzorkách kostnej drene v čase primárnej diagnózy aj sekundárnej ALL.

Všetky deti, s ktorých vzorkami sme v našich štúdiách pracovali, boli diagnostikované a liečené v centrách Pracovnej skupiny pre detskú hematológiu Českej republiky (CPH). Pre dilučné experimenty sme použili ako negatívnu kontrolu mononukleárne bunky z periférnej krvi zdravých darcov.

## **Izolácia DNA**

DNA z buniek pacientov a darcov bola izolovaná pomocou kitu QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, GmbH, Hilden, Germany). Izolácia vysokomolekulárnej DNA potrebnej pre amplifikáciu dlhých fragmentov bola uskutočnená vysoľovacou metódou podľa Millera (Miller, Dykes et al. 1988). DNA z buniek z krvných náterov bola izolovaná QIAamp DNA Blood Micro Kit (Qiagen, GmbH, Hilden, Germany).

## Ciele pre molekulárne-genetickú analýzu

Detekcia prestavieb sa uskutočnila pomocou PCR. K screeningu prestavieb Ig a TCR génov v diagnostickom materiále bolo použitých 18 rôznych PCR systémov (Pongers-Willemse, Seriu et al. 1999).

V prípade pozitivity screeningu na Ig/TCR prestavby bola určená klonalita PCR produktov pomocou heteroduplexovej analýzy v polyakrylamidovom géle (Goulden, Bader et al. 2003).

Prítomnosť FLT3/ITD sme zistili pomocou polymerázovej reťazovej reakcie (PCR) s použitím primerov 11F (5'- GCA ATT TAG GTA TGA AAG CCA GC-3') a 12R (5'- CTT TCA GCA TTT TGA GGG CAA CC -3') (Kiyoi, Naoe et al. 1999). PCR produkty boli separované v 2% agarózovom géle, vyrezané a purifikované pomocou Qiagen gel extraction kitu (QIAGEN, Hilden, Germany) a sekvenované. Zlomové intrónové miesta fúznych génov PML/RARalfa a CBFbeta/MYH11 sme detekovali pomocou „long-distance PCR“ (LD-PCR). Na amplifikáciu fúzneho génu PML/RARalfa sme použili 9 primerov a na fúziu CBFbeta/MYH11 sedem primerov rozmiestnených v intrónoch zúčastnených génov (McHale, Wiemels et al. 2003). Na vyhľadanie intrónovej fúzie AML1/ETO génu sme použili 18 reakcií multiplex LD-PCR. V 18 reakciách boli použité vždy 2 zo 4 AML primerov v kombinácii s jedným z deviatich ETO primerov (Wiemels, Xiao et al. 2002). K identifikácii genomickej fúzie TEL/AML1 sme použili pre každého pacienta 30 reakcií. Primery TEL6B alebo TEL8B boli použité v kombinácii s jedným z 15 primerov umiestnených v géne AML (Maia, Ford et al. 2001).

Na stanovenie fúzneho partnera génu MLL a zlomového miesta bola použitá inverzná LD-PCR (Meyer, Schneider et al. 2005). DNA bola sekvenovaná pomocou kapilárnej elektroforézy ABI PRISM<sup>®</sup> 310 Genetic Analyzer a BigDye<sup>™</sup> Primer v.3.0. Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA). Získané sekvencie boli analyzované s použitím software Chromas 1.5 (TECHNELYSIUM, Queensland, Australia). Identifikácia FLT3/ITD a fúznych génov bola vykonaná pomocou software BLAST.

## PCR

DNA z Guthrieho kartičiek sme izolovali pomocou kitov QIAamp DNA Blood Micro Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) alebo INSTAGENE™ DRY BLOOD Kit (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). V niektorých prípadoch boli Guthrieho kartičky dvakrát premyté vodou aby sa odplavili inhibítory PCR (Kempski, Mensa-Bonsu et al. 2003), vysušené, a následne priamo použité v PCR reakcii. S Guthrieho kartičkami sme pracovali v samostatnej miestnosti, aby sme minimalizovali riziko kontaminácie.

Po nájdení genomických fúzií génov PML/RAR $\alpha$ , CBF $\beta$ /MYH11, AML1/ETO, TEL/AML1 a MLL prestavieb sme navrhli pacient-špecifické primery tak, aby ležali v blízkosti zlomového miesta. Na návrh primerov bol použitý software VECTOR NTI (INFORMAX, Bethesda, MD, USA). Klonálne špecifické primery prestavieb Ig/TCR génov boli navrhnuté v ich špecifickom N úseku (V-N-D, D-N-J, V-N-J alebo V-N-Kde). Primery pre detekciu FLT3/ITD boli navrhnuté tak, aby amplifikovali len DNA s duplikáciou.

Na všetkých kartičkách bola úspešne vykonaná amplifikácia kontrolného génu pre beta-globín. MLL/FOXO3A a DH1/JH prestavby sme stanovovali kvantitatívne pomocou RQ-PCR. Ostatné markery sme analyzovali pomocou dvojkolovej PCR.

U všetkých pacientov boli pre každý marker uskutočnené dilučné experimenty, v ktorých bola DNA získaná z buniek pacienta nariedená do DNA z buniek periférnej krvi zdravých darcov.

Každý PCR systém bol optimalizovaný pomocou teplotne gradientovej PCR, rôznych koncentrácií horčička, prípadne rôznych koncentrácií primerov.

## **FISH**

Na detekciu prestavby MLL génu pomocou FISH metódy bola použitá sonda LSI MLL Spectrum Orange, ktorá špecificky hybridizuje so sekvenciami MLL génu v oblasti 11q23, a referenčná sonda LSI MLL Spectrum Green.

## **SNP array**

Vyšetrenie SNP array bolo prevedené Dr. Lyndal Kearney v laboratóriu Institute of Cancer Research v Londýne.

## Výsledky

Výsledky sú podrobne popísané v priložených publikáciach.

### **Etiológia primárnych leukémií - analýza prenatálneho pôvodu**

Výsledky našej analýzy Guthrieho kartičiek a charakteristiky vyšetovaných pacientov sú zhrnuté v tabuľke 4 (ALL pacienti) a v tabuľke 5 (AML pacienti). V našom súbore 12 ALL pacientov sa podarilo pomocou heteroduplexovej analýzy nájsť 15 Ig/TCR prestavieb. Traja pacienti boli nositeľmi hybridného génu TEL/AML1. Pre jednotlivé prestavby sme navrhli klonálne špecifické primery. Pre TEL/AML1 pozitívnych pacientov boli navrhnuté primery na detekciu fúzneho génu TEL/AML1 na DNA úrovni. U jedného pacienta sme analyzovali Guthrieho kartičku na Ig/TCR prestavby aj translokáciu TEL/AML1. U pacientov s AML sme použili ako klonálne markery pre leukemické bunky zlomy fúzných génov AML1/ETO, PML/RARalfa, CBFbeta/MYH11, MLL/AF6, MLL/AF9 a MLL/AF10 a/alebo FLT3/ITD.

Do nášho súboru vhodného na analýzu prenatálneho pôvodu sme v prvej etape zahrnuli celkom 26 pacientov s diagnózou akútnej myeloidnej leukémie (AML). Z archívu sa nám následne podarilo získať 17 Guthrieho kartičiek čo predstavuje 2/3 pôvodného súboru.

Úspešnosť hľadania zlomových miest na DNA úrovni bola veľmi vysoká, ale nie stopercentná. Je potrebné sa zmieniť, že zatiaľ čo zlomy CBFbeta/MYH11, PML/RARalfa a MLL prestavby sme identifikovali všetky, zo šiestich analyzovaných pacientov s AML1/ETO fúznym génom sa nám úspešne podarilo analyzovať len dvoch. Aj keď sú „zlomové“ intróny génov AML1 a ETO relatívne dlhé (asi 25 respektíve 45 kb), vysvetlenie hľadáme skôr v nižšom zastúpení malígnych blastov a horšej kvalite DNA v diagnostických vzorkách týchto pacientov lebo napríklad fúzia génu TEL/AML1 s ešte dlhšími intrónmi (až 100 kb) sa nám darila amplifikovať úspešne. Analýza týchto pacientov s AML1/ETO sa následne nepodarila ani kolegom v laboratóriu prof. Wiemelsa v Californii, kde s hľadaním intronových fúzií u tohto génu majú vo svete najväčšie skúsenosti.



Každý PCR systém bol optimalizovaný pomocou teplotne gradientovej PCR, rôznych koncentrácií horčička, prípadne rôznych koncentrácií primerov. Citlivosť našich analýz bola  $\geq 10^{-4}$  (teda 1 bunka z diagnostickej vzorky vo  $\geq 10\,000$  iných bunkách) okrem dvoch pacientov (AML13 a AML8), ktorí mali nízke percento blastov v diagnostickej vzorke (5,2 a 30% blastov). U týchto pacientov bola citlivosť niektorých experimentov (10/24) len  $10^{-3}$ . Amplifikácia kontrolného génu (beta-globín) bola úspešná zo všetkých Guthrieho kartičiek.

U troch pacientov s diagnózou ALL (25% vyšetovaných) sme markery leukemických buniek detekované v diagnostickom materiáli zistili aj na Guthrieho kartičkách. Prvý pacient s prestavbami TCR-delta Vd2/Dd3 a IgH VH3/JH5 mal obidve prestavby prítomné aj na Guthrieho kartičkách. Druhý pacient s Ig-kapa Vk1/Kde a TCR-gama VgI/Jg1.3-2.3 mal v novorodeneckom materiáli detekovanú len druhú prestavbu. U tretieho pacienta s fúznym génom TEL/AML1 v čase diagnózy ALL sme túto translokáciu zistili aj na Guthrieho kartičke. Celkovo sme v našej práci potvrdili prenatálny pôvod u 25% pacientov s ALL. U pacientov s AML sme však na Guthrieho kartičkách (pre-) leukemické bunky nesúce niektorú z hľadaných aberácií nenašli ani v jednom prípade.

<b>Tab. 4</b> Charakteristika ALL pacientov a výsledky analýzy Guthrieho kartičiek					
<b>Pacient</b>	<b>Typ prestavby</b>	<b>Citlivosť detekcie</b>	<b>% blastov pri diagnóze</b>	<b>Vek pri diagnóze</b>	<b>Guthrieho kartička</b>
1.	Vd2	$10^{-4}$	neurčený	3 roky	negatívna
	VH3	$10^{-5}$			negatívna
2.	VH3	$10^{-4}$	50%	3 roky	negatívna
	TEL/AML1	$10^{-4}$ - $10^{-5}$			negatívna
3.	VgI	$10^{-5}$	>55%	4 roky	<b>pozitívna</b>
	VkIA	$10^{-4}$			negatívna
4.	Vd2	$10^{-5}$	neurčený	4 roky	<b>pozitívna</b>
	VH3	$10^{-4}$			<b>pozitívna</b>
5.	VH3	$10^{-5}$	70%	4 roky	negatívna
6.	VH3	$10^{-4}$	84%	2 roky	negatívna
	VH1	$10^{-5}$			negatívna
7.	VH1	$10^{-5}$	83%	3 roky	negatívna
8.	VH3	$10^{-4}$	79%	3 roky	negatívna
9.	VH3	$10^{-4}$	89%	2 roky	negatívna
	VH4	$10^{-5}$			negatívna
10.	VgI	$10^{-4}$	>30%	4 roky	negatívna
11.	TEL/AML1	$10^{-4}$ - $10^{-5}$	80%	6 rokov	negatívna
12.	TEL/AML1	$10^{-5}$	77%	4 roky	<b>pozitívna</b>

<b>Tab. 5</b> Charakteristika AML pacientov a výsledky analýzy Guthrieho kartičiek					
<b>Pacient</b>	<b>Typ prestavby</b>	<b>Citlivosť detekcie</b>	<b>% blastov pri diagnóze</b>	<b>Vek pri diagnóze</b>	<b>Guthrieho kartička</b>
1.	FLT3/ITD	$10^{-5}$	87%	2 roky	negatívna
2.	FLT3/ITD	$10^{-5}$	70%	9 rokov	negatívna
	PML/RARalfa	$10^{-4}$ - $10^{-5}$			negatívna
3.	PML/RARalfa	$10^{-4}$ - $10^{-5}$	>80%	14 rokov	negatívna
4.	PML/RARalfa	$10^{-4}$	55%	8 rokov	negatívna
5.	PML/RARalfa	$10^{-4}$ - $10^{-5}$	64%	7 rokov	negatívna
6.	CBFbeta/MYH11	$10^{-4}$ - $10^{-5}$	82%	5 rokov	negatívna
7.	CBFbeta/MYH11	$10^{-4}$	70%	6 rokov	negatívna
8.	CBFbeta/MYH11	$10^{-3}$ - $10^{-4}$	30%	4 roky	negatívna
9.	MLL/AF6	$10^{-4}$ - $10^{-5}$	73%	1 rok	negatívna
10.	MLL/AF9	$10^{-4}$ - $10^{-5}$	70%	2 roky	negatívna
11.	MLL/AF10	$10^{-4}$	78%	5 rokov	negatívna
12.	AML1/ETO	$10^{-4}$ - $10^{-5}$	40%	10 rokov	negatívna
13.	AML1/ETO	$10^{-3}$ - $10^{-4}$	5,2%	14 rokov	negatívna

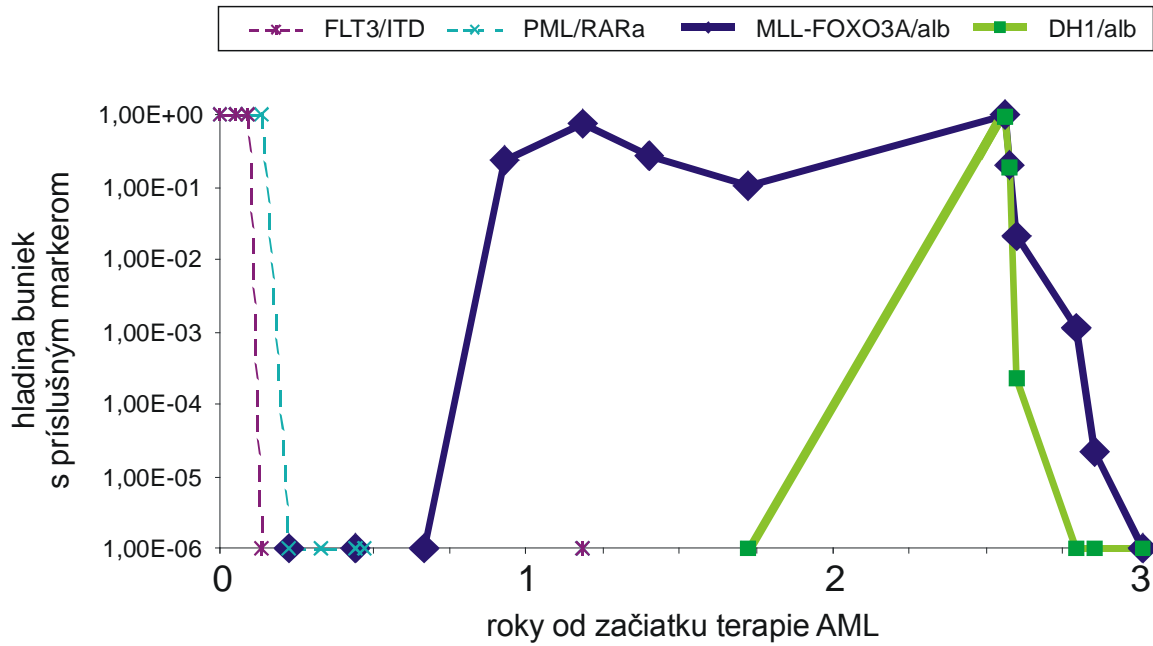
## Etiológia sekundárnej leukémie

Sledovali sme dynamiku vzniku sekundárnej leukémie u pacientky diagnostikovanej vo veku 15 rokov na AML-M3 s fúznym génom PML/RAR $\alpha$  a duplikáciou génu FLT3 (FLT3/ITD). Pacientka bola liečená podľa protokolu AML-BFM98. Po 2,5 roku u nej bola diagnostikovaná sekundárna ALL (sALL) z B-prekurzorov. Na rozdiel od pôvodnej AML bola pri diagnóze sALL prítomná nekompletná prestavba ťažkého reťazca imunoglobulínu (DH1/JH) a translokácia t(6;11)(q21;q23) s fúznym génom MLL/FOXO3A.

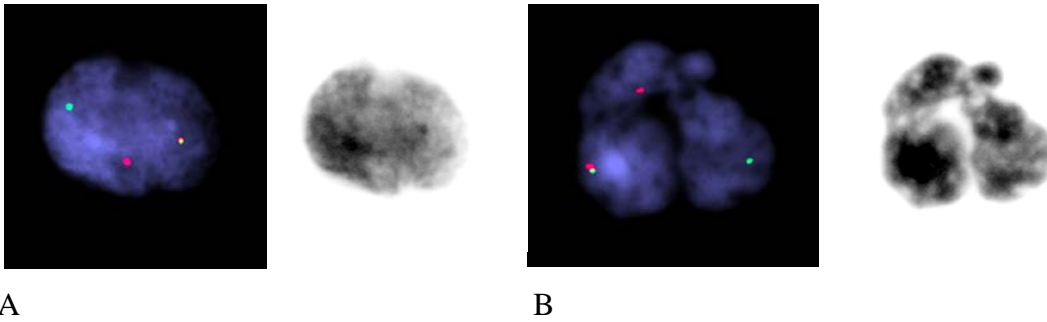
Pre každý marker reprezentujúci leukemické blasty AML-M3 (PML/RAR $\alpha$ , FLT3/ITD) a sekundárnu ALL (MLL/FOXO3A, DH1/JH prestavby) sme navrhli špecifické primery. Každý PCR systém bol pred analýzou archivovaného materiálu v priebehu terapie AML-M3 optimalizovaný pomocou teplotne gradientovej PCR, rôznych koncentrácií horčička, prípadne rôznych koncentrácií primerov.

Našli sme intrónovú fúziu génov MLL a FOXO3A a optimalizovali PCR na pacient-špecifickú kvantitatívnu detekciu MLL/FOXO3A a DH1/JH prestavieb na DNA úrovni s citlivosťou  $10^{-4}$ .

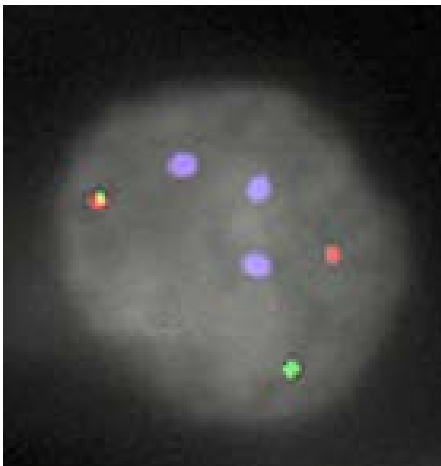
Analýza archivovaného materiálu odobraného pred diagnózou sALL ukázala, že zatiaľ čo DH1/JH prestavba (marker leukemického klonu) bola detekovateľná až v diagnostickej vzorke, a v poslednom predchádzajúcom odbere (10 mesiacov pred sALL) bola negatívna, fúzia MLL/FOXO3A sa objavila už 20 mesiacov pred sALL. Počet buniek s MLL prestavbou 20 mesiacov pred sALL bol nečakane vysoký – v 4 po sebe idúcich odberoch 20-10 mesiacov pred sALL sa pohyboval medzi 10-75% všetkých jadrových buniek drene (obr. 3). Pri zreteľnej supresii B rady (CD19+ bunky < 1%) bola prestavba nutne prítomná aj v iných než lymfoidných bunkách, čo potvrdila aj metóda interfáznej fluorescenčnej hybridizácie in situ - I-FISH (~90% interfáznych buniek drene s MLL prestavbou) (obr. 4). Vyšetrenie SNPs (single nucleotide polymorphism) a metóda FISH (obr. 5) ukázali, že medzi leukemickým a preleukemickým štádiom došlo k amplifikácii asi 10Mb úseku na konci 19q.



**Obr. 3** Analýza archivovaných vzoriek počas terapie AML pred nástupom ALL



**Obr. 4** MLL prestavba v lymfoidnom (A) a myeloidnom (B) progenitore 16 mesiacov pred diagnózou sekundárnej ALL



**Obr. 5** Súčasná prítomnosť MLL prestavby (červeno-zelená sonda) a amplifikácie 19q (fialovo značená sonda) v blaste sekundárnej ALL.

## Diskusia

### Etiológia primárnych leukémií - analýza prenatálneho pôvodu

V našom súbore sme vyšetřovali Guthrieho kartičky 25 pacientov, ktorí boli v neskoršom veku liečení na akútnu leukémiu. Výsledky analýzy prenatálneho pôvodu pacientov s ALL sa zhodujú s výsledkami predchádzajúcich štúdií venujúcich sa backtrackingu ALL. V našom súbore 12 detí s ALL sa podarilo nájsť špecifický klonálny marker leukemických buniek u 3 z 12 ALL pacientov (25%).

V porovnaní s ALL, ktorých in utero pôvod bol potvrdený v niekoľkých desiatkach prípadov, je o prenatálnom pôvode nekojeneckých AML informácií omnoho menej. Presvedčivý dôkaz o prenatálnom pôvode bol podaný iba u AML s translokáciou AML1/ETO - u piatich detí z desiatich pacientov bol fúzny gén prítomný na Guthrieho kartičke (Wiemels, Xiao et al. 2002). In utero pôvod u iných subtypov detských myeloidných leukémií bol vyšetřovaný len výnimočne. Doposiaľ bola popísaná jedna Guthrieho kartička CBFbeta/MYH11 pozitívna, jedna PML/RARalfa pozitívna a jedna MLL/AF10 pozitívna (Jones, Neat et al. 2003; McHale, Wiemels et al. 2003).

Dôvodov, prečo sú informácie o etiológii detských AML v porovnaní s ALL pomerne vzácne, je niekoľko. Najdôležitejšiu úlohu hrajú asi fakty, že incidencia AML je u detí cca 5-krát nižšia, a neexistuje univerzálny senzitivny marker pre sledovanie malígnych buniek, akým sú prestavby Ig/TCR génov u ALL.

Nám sa v našej štúdií podarilo získať a vyšetřiť Guthrieho kartičky 13 detí s diagnózou AML, u ktorých sme našli dostatočne citlivý pacient-špecifický cieľ na detekciu (pre-)leukemických buniek. Skúmali sme prenatálny pôvod 6 rôznych fúznych génov a tandemovej duplikácie génu FLT3. Tandemové duplikácie génu FLT3 na Guthrieho kartičkách zatiaľ okrem našej štúdie neboli nikdy skúmané. V našej práci sme skúmali tri rôzne fúzne gény obsahujúce gén MLL (MLL/AF6, MLL/AF9 a MLL/AF10). MLL prestavby sú úzko spojené s vrodenými a kojeneckými leukémiami. U starších detí sú menej obvyklé a dosiaľ boli popísané len tri prípady nekojeneckej leukémie s prekázaným prenatálnym pôvodom – case report MLL/AF10 pozitívnej AML spome-

nutý vyššie (Jones, Neat et al. 2003) a dvaja MLL/AF pozitívni pacienti s ALL diagnostikovanou vo veku 2, respektíve 6 rokov (Gale, Ford et al. 1997; Maia, Koechling et al. 2004). Najmladší z našich MLL-pozitívnych pacientov (AML9 s fúznym génom MLL/AF6) mal pri diagnóze 18 mesiacov.

Veľkosť (pre-)leukemického klonu môže pri analýze Guthrieho kartičiek hrať zásadnú úlohu. Na jednej škvrne sa nachádza asi len 30 000 buniek a kvalita DNA býva rôzna (závisí na dĺžke a podmienkach skladovania). Z tohto dôvodu sme pacientšpecifické primery pre prvé kolo PCR navrhovali tak, aby bola maximálna dĺžka amplikónu 150-200 párov bází, čo umožňuje amplifikáciu i veľmi fragmentovanej DNA. Požadovaná citlivosť detekcie ( $\geq 10^{-4}$ ) bola dosiahnutá u 12/14 cieľov. Zostávajúci dvaja pacienti (AML8 a AML13) mali pozitívne len niektoré replikáty riedenia  $10^{-4}$  a senzitivita detekcie u nich teda bola stanovená na  $10^{-3}$ - $10^{-4}$ . Obaja títo pacienti však mali vo vzorke z diagnózy ochorenia, ktorý slúži v dilučných experimentoch ako riedenie  $10^0$ , veľmi nízky počet blastov v kostnej dreni a dosiahnutá citlivosť je teda vlastne rovná detekcii 3 pozitívnych buniek v  $10^{-4}$ - $10^{-5}$ , respektíve 5 pozitívnych buniek v  $10^{-5}$ - $10^{-6}$  buniek. Naša metóda teda umožnila u všetkých pacientov detekovať (pre-)leukemické bunky na Guthrieho kartičkách za predpokladu, že aspoň 1-3 kópie hľadanej aberácie sú na kartičke prítomné. I táto v podstate optimálna citlivosť detekcie však nemusí viesť k pozitívnemu výsledku. Pokiaľ je veľkosť klonu menšia než  $3 \times 10^{-4}$ , nemusí byť na krvnej škvrne zastúpený ani jednou bunkou. Takáto situácia nie je úplne nepravdepodobná – pri prepočte na jadrové bunky v krvnom obehú novorodenca znamená zastúpenie  $1 \times 10^{-4}$  relatívne veľký klon (asi  $10^6$ - $10^7$  buniek).

Vysoká citlivosť detekcie zvyčajne zvyšuje riziko kontaminácie a kladie tak veľké nároky na čistotu práce. My sme z tohoto dôvodu s Guthrieho kartičkami pracovali v oddelenom laboratóriu, vo všetkých reakciách boli zahrnuté negatívne kontroly, a pozitívna kontrola pre PCR bola vysoko nariedená ( $10^{-4}$ - $10^{-5}$ ), aby sa minimalizovalo riziko kontaminácie. V priebehu štúdie sme nezaznamenali žiadnu kontamináciu negatívnych kontrolných vzoriek, všetky Guthrieho kartičky od zdravých novorodencov použité ako kontroly boli negatívne.

Použitelnosť zvoleného prístupu potvrdzujú výsledky zo súboru pacientov s ALL. Pri aplikácii rovnakej metodiky a pri rovnakej citlivosti PCR sme našli pozitívne

Guthrieho kartičky u 25% pacientov, a to ako detekciou Ig/TCR prestavieb, tak aj intrónovej fúzie génu TEL/AML1.

## **Etiológia sekundárnej leukémie**

Monitorovanie dynamiky a mechanizmov vzniku akútnych leukémií (AL) obvykle limituje absencia archivovaného materiálu pred diagnózou AL. Pri sekundárnych leukémiách však môže byť dostupnosť predchádzajúcich vzoriek vyššia.

Analyzovali sme archivovaný materiál odobraný pred diagnózou sekundárnej ALL na prítomnosť pre-leukemických buniek charakterizovaných fúznym génom MLL/FOXO3A. MLL/FOXO3A fúzia sa objavila už 20 mesiacov pred diagnózou sALL a 16 mesiacov pred sALL bola uvedená translokácia prítomná vo väčšine buniek kostnej drene (70-90%). Vysoké percento MLL/FOXO3A pozitívnych buniek bolo okrem kvantitatívnej polymerázovej reťazovej reakcie (RQ-PCR) doložené aj metódou interfáznej fluorescenčnej hybridizácie in situ I-FISH.

V kostnej dreni bola pozorovaná v tomto časovom bode pozorovaná zreteľná supresia B rady (CD19+ bunky < 1%). Morfológické vyšetrenie kostnej drene z tohto obdobia (16 mesiacov pred diagnózou sALL) neodhalilo žiadne známky leukémie. Tieto zistenia naznačujú, že prestavba bola nutne prítomná aj v iných než lymfoidných bunkách, čo nakoniec potvrdila aj metóda interfáznej fluorescenčnej hybridizácie in situ - I-FISH (~90% interfáznych buniek drene s MLL prestavbou). Iniciálnym leukemogénnym zásahom bol teda s najväčšou pravdepodobnosťou vznik MLL/FOXO3A vo veľmi včasnom hematopoetickom progenitore. Fúzny gén sme preto zistili v rôznych krvotvorných líniách.

Dosiaľ bolo publikovaných len niekoľko prác zaoberajúcich sa backtrackingom sekundárnej leukémie v priebehu liečby primárneho ochorenia (Megonigal, Cheung et al. 2000; Blanco, Dervieux et al. 2001; Metzler, Strissel et al. 2004; Ng, Ravetto et al. 2004), hlavné výsledky týchto prác sú zhrnuté v kapitole „Charakteristika a backtracking sekundárnych leukémií spojených s translokáciami génu MLL“. Vo všetkých prácach sa jednalo o pomaly expandujúce klony s MLL prestavbou.



V prípade nami popisovanej pacientky MLL/FOXO3A pozitívne bunky neboli úplne leukemické, lebo skoro 2 roky nevyvolali ochorenie. Druhým zásahom potrebným ku vzniku leukémie mohla byť amplifikácia niektorého z génov, ktoré sa nachádzajú na konci dlhého ramienka chromozómu 19. Vyšetrenie SNPs (single nucleotide polymorphism) ukázalo, že medzi preleukemickým a leukemickým štádiom došlo k amplifikácii asi 10Mb úseku na konci 19q. V tejto časti chromozómu sa nachádza približne 450 génov a preto nie je ľahké odhaliť, zmena funkcie ktorého z nich viedla k rozvoju leukémie. Nachádza sa tu hneď niekoľko potenciálnych kandidátov, ktorých deregulácia by mohla prispievať k leukemickému fenotypu. Príkladom sú gény kodujúce FLT3 ligand, interleukín 11, kinázu Aurora C, rastový faktor kmeňových buniek (SCGF) a proteíny s motívom zinkových prstov.

Odlišnosť medzi pre-leukemickým a leukemickým štádiom dokazuje aj prítomnosť nekompletnej prestavby ťažkého reťazca imunoglobulínu (DH1/JH). DH1/JH prestavba (marker leukemického klonu) je detekovateľná až v diagnostickej vzorke a v poslednom predchádzajúcom odbere (asi 10 mesiacov pred sALL) je negatívna.

V leukemogéneze tejto sALL je iniciálnym zásahom translokácia MLL/FOXO3A, ktorá však nie je dostatočná na vznik leukémie. Zatiaľ boli popísané len dva prípady leukémie s fúznym génom MLL/FOXO3A. V oboch sa jednalo o pacientov so sekundárnou AML po liečbe Hodgkinovho lymfómu. V ich liečbe ako aj v liečbe nami popisovanej pacientky bol podávaný etopozid, o ktorom je známe, že vyvoláva zlomy v géne MLL s potenciálnou možnosťou vzniku translokácií. Typ a vývoj leukémie u našej pacientky (sALL) však naznačuje odlišnú patogenézu ochorenia, ovplyvnenú pravdepodobne druhým zásahom.

Nález vysokého percenta MLL/FOXO3A pozitívnych buniek v pomerne dlhom časovom období pred diagnózou sALL nie je artefaktom. Okrem toho, že sme bunky detekovali rôznymi metódami a v rôznych odberoch, popísali sme vysoký počet preleukemických buniek s MLL prestavbou (MLL/MAML2) aj u nášho ďalšieho pacienta so sekundárnou leukémiou (rukopis v príprave). Na základe týchto pozorovaní sa domnievame, že MLL translokácie udeľujú bunkám proliferačnú výhodu. Postihnuté bunky však nie sú úplne leukemické – na to je potrebný minimálne jeden ďalší zásah,

ktorý indukuje zmenu v géne ovplyvňujúcom apoptózu alebo diferenciáciu. U našej pacientky by mohol byť umiestnený na krátkom ramienku chromozómu 19 (viď vyššie).

## Záver

Predkladaná práca sa zaoberá prenatalným pôvodom a etiológiou detských leukémií. Vyšetřili sme dosiaľ najväčší popísaný súbor detských pacientov s diagnózou AML na prítomnosť ich špecifických leukemických markerov v archivovanom novorodeneckom materiále – na Guthrieho kartičkách. Aj napriek tomu, že sme očakávali určité percento pozitívnych nálezov, u všetkých analyzovaných pacientov s AML bol výsledok negatívny. Rovnakou metodikou sme analyzovali aj pacientov s ALL a našli 25% pozitívnych Guthrieho kartičiek. Jedinou aberáciou, ktorá bola v novorodeneckom materiále nekojeneckých AML detekovaná inými skupinami viac než raz, bol fúzny gén AML1/ETO. Ani u jedného z dvoch úspešne vyšetrených pacientov s týmto markerom sme však prenatalný pôvod tejto aberácie nepotvrdili. Ostatné dokumentované prípady (CBFbeta/MYH11, PML/RARalfa, MLL/AF10) sú ojedinelé kazuistiky a naše údaje teda naznačujú, že prenatalný pôvod je u detských AML v porovnaní s ALL buď menej častý, alebo je veľkosť prenatalného (pre-)leukemického klonu u myeloidných leukémií významne menšia, čo zhoršuje jeho detekciu v archivovanom materiále.

V druhej časti práce sme skúmali dynamiku a mechanizmus vzniku sekundárnej ALL po liečbe AML. Primárna diagnóza skúmanej pacientky bola AML-M3 s fúznym génom PML/RARalfa a duplikáciou génu FLT3. Po 2,5 roku jej bola diagnostikovaná sekundárna ALL s translokáciou MLL/FOXO3A a nekompletnou prestavbou ťažkého reťazca imunoglobulínu (DH1/JH). Bunky s MLL prestavbou sa objavili už 20 mesiacov pred sALL, ich zastúpenie bolo nečakane vysoké a prestavba bola prítomná v rôznych hematopoetických bunkách. Vyšetrenie SNP array ukázalo, že medzi pre-leukemickým a leukemickým štádiom ochorenia došlo k amplifikácii asi 10 Mb úseku na konci 19q. Tu by teda mohol ležať gén zodpovedný za definitívnu malígnu transformáciu preleukemického klonu.

## Zoznam použitých skratiek

AF6	ALL1 fused gene from chromosome 6
AF9	ALL1 fused gene from chromosome 9
AF10	ALL1 fused gene from chromosome 10
ALL	akútna lymfoblastická leukémia
AML	akútna myeloidná leukémia
AML1	acute myeloid leukemia 1
APL	akútna promyelocytárna leukémia
ARHGEF17	Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 12
ATRA	all-trans retinová kyselina
bcr	Breakpoint Cluster Region
CBFbeta	subunit b of core binding factor
CEBPA	CCAAT/enhancer-binding protein alpha
CPH	Pracovná skupina pre detskú hematológiu Českej republiky (Czech Paediatric Haematology Working Group)
D	asparagín
EBV	Epstein-Barrovej vírus
ENL	eleven nineteen leukemia
ETO	eighth twenty one
ETV6	ETS variant gene 6
FAB	French American British
FKHRL1	forkhead homolog rhabdomyosarcoma like 1
FLT3	FMS-like tyrosine kinase 3
FOXO3A	forkhead box O3A
GAS7	growth arrest-specific 7
HDAC	histone deacetylase
HOX	homeobox

HTLV1	Human T-cell Leukemia Virus
I-FISH	interfázna fluorescenčná hybridizácia in situ
Ig	imunoglobulín
MDS	myelodysplastický syndróm
MLL	mixed lineage leukemia
MLLT3	mixed-lineage leukemia translocated to 3
MLLT4	mixed-lineage leukemia translocated to 4
MLLT10	mixed-lineage leukemia translocated to 10
MRN	minimálna reziduálna nemoc
mSin3a	mammalian SIN3 yeast homolog A gene
MTG16	myeloid translocation gene on chromosome 16
MTGR1	myeloid translocation gene-related protein 1
MYH	myosin heavy chain
N-CoR	nuclear receptor co-repressor gene
NuMA	nuclear mitotic apparatus protein
PDGF	Platelet-derived growth factor
PLZF	promyelocytic leukemia zinc finger
PML	Promyelocytic leukemia
RARalfa	Retinoic acid receptor, alpha
RQ-PCR	real-time quantitative polymerase chain reaction
RQ-RT-PCR	real-time quantitative reverse-transcriptase polymerase chain reaction
RUNX	runt-related transcription factor 1
RXR	retinoid X receptor
SCGF	stem cell growth factor
STAT5B	signal transducer and activator of transcription 5B
T-ALL	T-Cell Acute Lymphocytic Leukaemias
TCR	T-cell receptor
TEL	translocation ets leukemia
Y	tyrozín

## Zoznam publikácií, abstraktov a prednášok

### Publikácie:

**Burjanivova T.**, Madzo J., Muzikova K., Meyer C., Schneider B., Votava F., Marschalek R., Stary J., Trka J., Zuna J.: Prenatal origin of childhood AML occurs less frequently than in childhood ALL. *BMC Cancer*, 2006. 6: p. 100 (IF=1.99).

**Burjanivová T.**, Madžo J., Mužíková K., Meyer C., Schneider B., Starý J., Marschalek R., Votava F., Marschalek R., Trka J., Zuna J.: Je prenatální původ akutních myeloidních leukémií častý? *Česko-slovenská pediatrie*, 2006, roč. 61, č. 6, s. 344-349.

**Burjanivova T.**, Zuna J., Mejstrikova E., Zemanova Z., Muzikova K., Meyer C., Kearney L., Houdkova A., Ptozskova H., Stary J., Greaves M., Trka J.: Two-step model of leukaemia origin with MLL translocation as the first hit. *Dokončený rukopis pred odoslaním.*

### Abstrakty v časopisoch s IF:

**Burjanivova T.**, Madzo J., Muzikova K., Meyer C., Schneider B., Stary J., Marschalek R., Trka J., Zuna J.: In-Utero Origin of Childhood Acute Leukemias. 47<sup>th</sup> ASH Annual Meeting, Atlanta, Georgia, 2005. *Blood* 2005, 106(11): 1445.

**Burjanivova T.**, Madzo J., Muzikova K., Marschalek R., Pekova S., Stary J., Trka J., Zuna J.: In utero origins of childhood leukaemia. *Haematologica, The Hematology Journal*, June 2005, Vol. 90, Supp.2, 551.

### Prednášky:

**Burjanivová T.**, Vášková M., Kalina T., Trka J., Zuna, J.: Expresie signálních molekul LAT a PAG u leukémií. XV. Konference dětských hematologů a onkologů České a Slovenské republiky, České Budějovice.

## **Postery/ abstrakty v domácích časopisech a zbornících:**

**Burjanivová T.**, Zuna J., Mejstříková E., Zemanová Z., Mužíková K., Meyer C., Kearney L., Houdková A., Ptoszková H., Starý J., Greaves M., Trka J.: Dvouzásahový model vzniku sekundární leukemie s MLL přestavbou jako iniciální změnou. XX. Olomoucké hematologické dny s mezinárodní účastí, Olomouc, 2006.

**Burjanivová T.**, Mužíková K., Madžo J., Trka J., Peková S., Zuna J.: Prenatální původ dětských leukemií. XIX. Olomoucké hematologické dny s mezinárodní účastí, Olomouc, 2005.

**Burjanivová T.**, Mužíková K., Trka J., Peková S., Zuna, J.: Klonální markery akutních myeloidních leukemií a jejich původ. 14. pracovní konference dětských hematologů a onkologů ČR a SR, Průhonice, 2004.

## Referencie

1. Abu-Duhier, F. M., A. C. Goodeve, et al. (2001). "Genomic structure of human FLT3: implications for mutational analysis." *Br J Haematol* 113(4): 1076-7.
2. Adedayo, O., G. Grell, et al. (2003). "Hospital admissions for human T-cell lymphotropic virus type-1 (HTLV-1) associated diseases in Dominica." *Postgrad Med J* 79(932): 341-4.
3. Alcalay, M., D. Zangrilli, et al. (1991). "Translocation breakpoint of acute promyelocytic leukemia lies within the retinoic acid receptor alpha locus." *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(5): 1977-81.
4. Andersen, M. K., D. H. Christiansen, et al. (2001). "Therapy-related acute lymphoblastic leukaemia with MLL rearrangements following DNA topoisomerase II inhibitors, an increasing problem: report on two new cases and review of the literature since 1992." *Br J Haematol* 114(3): 539-43.
5. Arnould, C., C. Philippe, et al. (1999). "The signal transducer and activator of transcription STAT5b gene is a new partner of retinoic acid receptor alpha in acute promyelocytic-like leukaemia." *Hum Mol Genet* 8(9): 1741-9.
6. Bernard, O. A., J. Hillion, et al. (1998). "A new case of translocation t(6;11)(q21;q23) in a therapy-related acute myeloid leukemia resulting in an MLL-AF6q21 fusion." *Genes Chromosomes Cancer* 22(3): 221-4.
7. Blanco, J. G., T. Dervieux, et al. (2001). "Molecular emergence of acute myeloid leukemia during treatment for acute lymphoblastic leukemia." *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(18): 10338-43.
8. Boettner, B., E. E. Govek, et al. (2000). "The junctional multidomain protein AF-6 is a binding partner of the Rap1A GTPase and associates with the actin cytoskeletal regulator profilin." *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(16): 9064-9.
9. Borkhardt, A., G. Cazzaniga, et al. (1997). "Incidence and clinical relevance of TEL/AML1 fusion genes in children with acute lymphoblastic leukemia enrolled in the German and Italian multicenter therapy trials. Associazione Italiana Ematologia Oncologia Pediatrica and the Berlin-Frankfurt-Munster Study Group." *Blood* 90(2): 571-7.
10. Borrow, J., A. D. Goddard, et al. (1990). "Molecular analysis of acute promyelocytic leukemia breakpoint cluster region on chromosome 17." *Science* 249(4976): 1577-80.
11. Britos-Bray, M., M. Ramirez, et al. (1998). "CBFBeta-SMMHC, expressed in M4eo acute myeloid leukemia, reduces p53 induction and slows apoptosis in hematopoietic cells exposed to DNA-damaging agents." *Blood* 92(11): 4344-52.
12. Broeker, P. L., H. G. Super, et al. (1996). "Distribution of 11q23 breakpoints within the MLL breakpoint cluster region in de novo acute leukemia and in treatment-related acute myeloid leukemia: correlation with scaffold attachment regions and topoisomerase II consensus binding sites." *Blood* 87(5): 1912-22.
13. Brown, D., S. Kogan, et al. (1997). "A PMLRARalpha transgene initiates murine acute promyelocytic leukemia." *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(6): 2551-6.
14. Carli, P. M., C. Sgro, et al. (2000). "Increase therapy-related leukemia secondary to breast cancer." *Leukemia* 14(6): 1014-7.



15. Castilla, L. H., C. Wijmenga, et al. (1996). "Failure of embryonic hematopoiesis and lethal hemorrhages in mouse embryos heterozygous for a knocked-in leukemia gene CFBF-MYH11." *Cell* 87(4): 687-96.
16. Cimino, G., M. C. Rapanotti, et al. (1998). "ALL1 gene alterations in acute leukemia: biological and clinical aspects." *Haematologica* 83(4): 350-7.
17. Cox, M. C., P. Panetta, et al. (2004). "Chromosomal aberration of the 11q23 locus in acute leukemia and frequency of MLL gene translocation: results in 378 adult patients." *Am J Clin Pathol* 122(2): 298-306.
18. Creutzig, U., D. Reinhardt, et al. (2001). "Intensive chemotherapy versus bone marrow transplantation in pediatric acute myeloid leukemia: a matter of controversies." *Blood* 97(11): 3671-2; author reply 3674-5.
19. Dann, E. J. and J. M. Rowe (2001). "Biology and therapy of secondary leukaemias." *Best Pract Res Clin Haematol* 14(1): 119-37.
20. Dash, A. and D. G. Gilliland (2001). "Molecular genetics of acute myeloid leukaemia." *Best Pract Res Clin Haematol* 14(1): 49-64.
21. Davis, J. N., L. McGhee, et al. (2003). "The ETO (MTG8) gene family." *Gene* 303: 1-10.
22. de Guzman, C. G., A. J. Warren, et al. (2002). "Hematopoietic stem cell expansion and distinct myeloid developmental abnormalities in a murine model of the AML1-ETO translocation." *Mol Cell Biol* 22(15): 5506-17.
23. de The, H., C. Chomienne, et al. (1990). "The t(15;17) translocation of acute promyelocytic leukaemia fuses the retinoic acid receptor alpha gene to a novel transcribed locus." *Nature* 347(6293): 558-61.
24. del Mar Bellido, M. and J. F. Nomdedeu (1999). "Adult de novo acute myeloid leukemias with MLL rearrangements." *Leuk Res* 23(6): 585-8.
25. Di Croce, L., V. A. Raker, et al. (2002). "Methyltransferase recruitment and DNA hypermethylation of target promoters by an oncogenic transcription factor." *Science* 295(5557): 1079-82.
26. DiMartino, J. F., P. M. Ayton, et al. (2002). "The AF10 leucine zipper is required for leukemic transformation of myeloid progenitors by MLL-AF10." *Blood* 99(10): 3780-5.
27. Dimartino, J. F. and M. L. Cleary (1999). "Mll rearrangements in haematological malignancies: lessons from clinical and biological studies." *Br J Haematol* 106(3): 614-26.
28. Dockerty, J. D., G. Draper, et al. (2001). "Case-control study of parental age, parity and socioeconomic level in relation to childhood cancers." *Int J Epidemiol* 30(6): 1428-37.
29. Doll, R. and R. Wakeford (1997). "Risk of childhood cancer from fetal irradiation." *Br J Radiol* 70: 130-9.
30. Dror, Y. (2005). "Shwachman-Diamond syndrome." *Pediatr Blood Cancer* 45(7): 892-901.
31. Erickson, P., J. Gao, et al. (1992). "Identification of breakpoints in t(8;21) acute myelogenous leukemia and isolation of a fusion transcript, AML1/ETO, with similarity to Drosophila segmentation gene, runt." *Blood* 80(7): 1825-31.
32. Ernst, P., J. K. Fisher, et al. (2004). "Definitive hematopoiesis requires the mixed-lineage leukemia gene." *Dev Cell* 6(3): 437-43.

33. Fasching, K., S. Panzer, et al. (2001). "Presence of N regions in the clonotypic DJ rearrangements of the immunoglobulin heavy-chain genes indicates an exquisitely short latency in t(4;11)-positive infant acute lymphoblastic leukemia." *Blood* 98(7): 2272-4.
34. Ford, A. M., C. A. Bennett, et al. (1998). "Fetal origins of the TEL-AML1 fusion gene in identical twins with leukemia." *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(8): 4584-8.
35. Ford, A. M., M. S. Pombo-de-Oliveira, et al. (1997). "Monoclonal origin of concordant T-cell malignancy in identical twins." *Blood* 89(1): 281-5.
36. Ford, A. M., M. S. Pombo-de-Oliveira, et al. (1997). "Monoclonal origin of concordant T-cell malignancy in identical twins
37. Intrauterine monoclonal origin of neonatal concordant acute lymphoblastic leukemia in monozygotic twins." *Blood* 89(1): 281-5.
38. Frank, R. C., X. Sun, et al. (1999). "The t(8;21) fusion protein, AML1/ETO, transforms NIH3T3 cells and activates AP-1." *Oncogene* 18(9): 1701-10.
39. Gale, K. B., A. M. Ford, et al. (1997). "Backtracking leukemia to birth: identification of clonotypic gene fusion sequences in neonatal blood spots." *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(25): 13950-4.
40. Gamou, T., E. Kitamura, et al. (1998). "The partner gene of AML1 in t(16;21) myeloid malignancies is a novel member of the MTG8(ETO) family." *Blood* 91(11): 4028-37.
41. Gilham, C., J. Peto, et al. (2005). "Day care in infancy and risk of childhood acute lymphoblastic leukaemia: findings from UK case-control study." *Bmj* 330(7503): 1294.
42. Goulden, N., P. Bader, et al. (2003). "Minimal residual disease prior to stem cell transplant for childhood acute lymphoblastic leukaemia." *Br J Haematol* 122(1): 24-9.
43. Greaves, M. (1999). "Molecular genetics, natural history and the demise of childhood leukaemia." *Eur J Cancer* 35(14): 1941-53.
44. Greaves, M. (2003). "Pre-natal origins of childhood leukemia." *Rev Clin Exp Hematol* 7(3): 233-45.
45. Greaves, M. (2006). "Infection, immune responses and the aetiology of childhood leukaemia." *Nat Rev Cancer* 6(3): 193-203.
46. Greaves, M. F. (1988). "Speculations on the cause of childhood acute lymphoblastic leukemia." *Leukemia* 2(2): 120-5.
47. Greaves, M. F., A. T. Maia, et al. (2003). "Leukemia in twins: lessons in natural history." *Blood* 102(7): 2321-33.
48. Greer, E. L. and A. Brunet (2005). "FOXO transcription factors at the interface between longevity and tumor suppression." *Oncogene* 24(50): 7410-25.
49. Grignani, F., S. De Matteis, et al. (1998). "Fusion proteins of the retinoic acid receptor-alpha recruit histone deacetylase in promyelocytic leukaemia." *Nature* 391(6669): 815-8.
50. Grignani, F., P. F. Ferrucci, et al. (1993). "The acute promyelocytic leukemia-specific PML-RAR alpha fusion protein inhibits differentiation and promotes survival of myeloid precursor cells." *Cell* 74(3): 423-31.
51. Grimwade, D., H. Walker, et al. (1998). "The importance of diagnostic cytogenetics on outcome in AML: analysis of 1,612 patients entered into the MRC AML 10 trial. The Medical Research Council Adult and Children's Leukaemia Working Parties." *Blood* 92(7): 2322-33.

52. Grisolano, J. L., R. L. Wesselschmidt, et al. (1997). "Altered myeloid development and acute leukemia in transgenic mice expressing PML-RAR alpha under control of cathepsin G regulatory sequences." *Blood* 89(2): 376-87.
53. Gowney, J. D., H. Shigematsu, et al. (2005). "Loss of Runx1 perturbs adult hematopoiesis and is associated with a myeloproliferative phenotype." *Blood* 106(2): 494-504.
54. Gu, Y., H. Alder, et al. (1994). "Sequence analysis of the breakpoint cluster region in the ALL-1 gene involved in acute leukemia." *Cancer Res* 54(9): 2326-30.
55. Gu, Y., T. Nakamura, et al. (1992). "The t(4;11) chromosome translocation of human acute leukemias fuses the ALL-1 gene, related to *Drosophila trithorax*, to the AF-4 gene." *Cell* 71(4): 701-8.
56. Hayakawa, F., M. Towatari, et al. (2000). "Tandem-duplicated Flt3 constitutively activates STAT5 and MAP kinase and introduces autonomous cell growth in IL-3-dependent cell lines." *Oncogene* 19(5): 624-31.
57. He, L. Z., F. Guidez, et al. (1998). "Distinct interactions of PML-RARalpha and PLZF-RARalpha with co-repressors determine differential responses to RA in APL." *Nat Genet* 18(2): 126-35.
58. He, L. Z., C. Tribioli, et al. (1997). "Acute leukemia with promyelocytic features in PML/RARalpha transgenic mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(10): 5302-7.
59. Heibert, S. W., B. Lutterbach, et al. (2001). "Mechanisms of transcriptional repression by the t(8;21)-, t(12;21)-, and inv(16)-encoded fusion proteins." *Cancer Chemother Pharmacol* 48 Suppl 1: S31-4.
60. Helbling, D., B. U. Mueller, et al. (2005). "CBFB-SMMHC is correlated with increased calreticulin expression and suppresses the granulocytic differentiation factor CEBPA in AML with inv(16)." *Blood* 106(4): 1369-75.
61. Hess, J. L., B. D. Yu, et al. (1997). "Defects in yolk sac hematopoiesis in Mll-null embryos." *Blood* 90(5): 1799-806.
62. Higuchi, M., D. O'Brien, et al. (2002). "Expression of a conditional AML1-ETO oncogene bypasses embryonic lethality and establishes a murine model of human t(8;21) acute myeloid leukemia." *Cancer Cell* 1(1): 63-74.
63. Hillion, J., M. Le Coniat, et al. (1997). "AF6q21, a novel partner of the MLL gene in t(6;11)(q21;q23), defines a forkhead transcriptional factor subfamily." *Blood* 90(9): 3714-9.
64. Hjalgrim, L. L., H. O. Madsen, et al. (2002). "Presence of clone-specific markers at birth in children with acute lymphoblastic leukaemia." *Br J Cancer* 87(9): 994-9.
65. Hrusak, O., J. Trka, et al. (2002). "Acute lymphoblastic leukemia incidence during socioeconomic transition: selective increase in children from 1 to 4 years." *Leukemia* 16(4): 720-5.
66. Hsieh, J. J., P. Ernst, et al. (2003). "Proteolytic cleavage of MLL generates a complex of N- and C-terminal fragments that confers protein stability and subnuclear localization." *Mol Cell Biol* 23(1): 186-94.
67. Hsieh, J. J., E. H. Cheng, et al. (2003). "Taspase1: a threonine aspartase required for cleavage of MLL and proper HOX gene expression." *Cell* 115(3): 293-303.
68. Huang, G., K. Shigesada, et al. (2004). "Molecular basis for a dominant inactivation of RUNX1/AML1 by the leukemogenic inversion 16 chimera." *Blood* 103(8): 3200-7.

69. Huang, M. E., Y. C. Ye, et al. (1988). "Use of all-trans retinoic acid in the treatment of acute promyelocytic leukemia." *Blood* 72(2): 567-72.
70. Chambon, P. (1996). "A decade of molecular biology of retinoic acid receptors." *Faseb J* 10(9): 940-54.
71. Chaplin, T., P. Ayton, et al. (1995). "A novel class of zinc finger/leucine zipper genes identified from the molecular cloning of the t(10;11) translocation in acute leukemia." *Blood* 85(6): 1435-41.
72. Chen, P., M. Levis, et al. (2005). "FLT3/ITD mutation signaling includes suppression of SHP-1." *J Biol Chem* 280(7): 5361-9.
73. Chen, Z., N. J. Brand, et al. (1993). "Fusion between a novel Kruppel-like zinc finger gene and the retinoic acid receptor-alpha locus due to a variant t(11;17) translocation associated with acute promyelocytic leukaemia." *Embo J* 12(3): 1161-7.
74. Ching, R. W., G. Dellaire, et al. (2005). "PML bodies: a meeting place for genomic loci?" *J Cell Sci* 118(Pt 5): 847-54.
75. Ichikawa, M., T. Asai, et al. (2004). "AML-1 is required for megakaryocytic maturation and lymphocytic differentiation, but not for maintenance of hematopoietic stem cells in adult hematopoiesis." *Nat Med* 10(3): 299-304.
76. Iida, S., M. Seto, et al. (1993). "MLLT3 gene on 9p22 involved in t(9;11) leukemia encodes a serine/proline rich protein homologous to MLLT1 on 19p13." *Oncogene* 8(11): 3085-92.
77. Infante-Rivard, C., I. Fortier, et al. (2000). "Markers of infection, breast-feeding and childhood acute lymphoblastic leukaemia." *Br J Cancer* 83(11): 1559-64.
78. Johnson, J. J., W. Chen, et al. (2003). "Prenatal and postnatal myeloid cells demonstrate stepwise progression in the pathogenesis of MLL fusion gene leukemia." *Blood* 101(8): 3229-35.
79. Jones, L. K., M. J. Neat, et al. (2003). "Cryptic rearrangement involving MLL and AF10 occurring in utero." *Leukemia* 17(8): 1667-9.
80. Jourdan-Da Silva, N., Y. Perel, et al. (2004). "Infectious diseases in the first year of life, perinatal characteristics and childhood acute leukaemia." *Br J Cancer* 90(1): 139-45.
81. Kakizuka, A., W. H. Miller, Jr., et al. (1991). "Chromosomal translocation t(15;17) in human acute promyelocytic leukemia fuses RAR alpha with a novel putative transcription factor, PML." *Cell* 66(4): 663-74.
82. Kang, H. J., S. H. Hong, et al. (2005). "Prognostic significance of FLT3 mutations in pediatric non-promyelocytic acute myeloid leukemia." *Leuk Res* 29(6): 617-23.
83. Kawa, K. (2000). "Epstein-Barr virus--associated diseases in humans." *Int J Hematol* 71(2): 108-17.
84. Kempfski, H., K. A. Mensa-Bonsu, et al. (2003). "Prenatal chromosomal diversification of leukemia in monozygotic twins." *Genes Chromosomes Cancer* 37(4): 406-11.
85. Khanna, K. K. (2000). "Cancer risk and the ATM gene: a continuing debate." *J Natl Cancer Inst* 92(10): 795-802.
86. Kim, K. T., K. Baird, et al. (2005). "Pim-1 is up-regulated by constitutively activated FLT3 and plays a role in FLT3-mediated cell survival." *Blood* 105(4): 1759-67.

87. Kiyoi, H., T. Naoe, et al. (1999). "Prognostic implication of FLT3 and N-RAS gene mutations in acute myeloid leukemia." *Blood* 93(9): 3074-80.
88. Kogan, S. C., E. Lagasse, et al. (1998). "The PEBP2betaMYH11 fusion created by Inv(16)(p13;q22) in myeloid leukemia impairs neutrophil maturation and contributes to granulocytic dysplasia." *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(20): 11863-8.
89. Kondo, M., K. Horibe, et al. (1999). "Prognostic value of internal tandem duplication of the FLT3 gene in childhood acute myelogenous leukemia." *Med Pediatr Oncol* 33(6): 525-9.
90. Kottaridis, P. D., R. E. Gale, et al. (2001). "The presence of a FLT3 internal tandem duplication in patients with acute myeloid leukemia (AML) adds important prognostic information to cytogenetic risk group and response to the first cycle of chemotherapy: analysis of 854 patients from the United Kingdom Medical Research Council AML 10 and 12 trials." *Blood* 98(6): 1752-9.
91. Kottaridis, P. D., R. E. Gale, et al. (2002). "Studies of FLT3 mutations in paired presentation and relapse samples from patients with acute myeloid leukemia: implications for the role of FLT3 mutations in leukemogenesis, minimal residual disease detection, and possible therapy with FLT3 inhibitors." *Blood* 100(7): 2393-8.
92. Kratz, C. P., L. Antonietti, et al. (2003). "Acute myeloid leukemia associated with t(8;21) or trisomy 8 in children with neurofibromatosis, type 1." *J Pediatr Hematol Oncol* 25(4): 343.
93. Langabeer, S. E., H. Walker, et al. (1997). "Incidence of AML1/ETO fusion transcripts in patients entered into the MRC AML trials. MRC Adult Leukaemia Working Party." *Br J Haematol* 99(4): 925-8.
94. Lee, J. W., Y. C. Lee, et al. (2001). "Transcriptional coregulators of the nuclear receptor superfamily: coactivators and corepressors." *Cell Mol Life Sci* 58(2): 289-97.
95. Leone, G., L. Mele, et al. (1999). "The incidence of secondary leukemias." *Haematologica* 84(10): 937-45.
96. Liang, D. C., L. Y. Shih, et al. (2002). "Clinical relevance of internal tandem duplication of the FLT3 gene in childhood acute myeloid leukemia." *Cancer* 94(12): 3292-8.
97. Lin, R. J., L. Nagy, et al. (1998). "Role of the histone deacetylase complex in acute promyelocytic leukaemia." *Nature* 391(6669): 811-4.
98. Liu, P., S. A. Tarle, et al. (1993). "Fusion between transcription factor CBF beta/PEBP2 beta and a myosin heavy chain in acute myeloid leukemia." *Science* 261(5124): 1041-4.
99. Lutterbach, B., J. J. Westendorf, et al. (1998). "ETO, a target of t(8;21) in acute leukemia, interacts with the N-CoR and mSin3 corepressors." *Mol Cell Biol* 18(12): 7176-84.
100. Lyman, S. D. and S. E. Jacobsen (1998). "c-kit ligand and Flt3 ligand: stem/progenitor cell factors with overlapping yet distinct activities." *Blood* 91(4): 1101-34.
101. Ma, X., P. A. Buffler, et al. (2002). "Daycare attendance and risk of childhood acute lymphoblastic leukaemia." *Br J Cancer* 86(9): 1419-24.
102. Madžo, J., K. Mužíkova, et al. (2003). "Intrauterinní původ akutní lymfoblastické leukémie u dětí: průkaz leukemického klonu v archivních vzorcích novorozenecké krve." *Transfuze a hematologie dnes* 9(2): 80-84.

103. Maia, A. T., A. M. Ford, et al. (2001). "Molecular tracking of leukemogenesis in a triplet pregnancy." *Blood* 98(2): 478-82.
104. Maia, A. T., J. Koechling, et al. (2004). "Protracted postnatal natural histories in childhood leukemia." *Genes Chromosomes Cancer* 39(4): 335-40.
105. Maia, A. T., V. H. van der Velden, et al. (2003). "Prenatal origin of hyperdiploid acute lymphoblastic leukemia in identical twins." *Leukemia* 17(11): 2202-6.
106. Mangelsdorf, D. J. and R. M. Evans (1995). "The RXR heterodimers and orphan receptors." *Cell* 83(6): 841-50.
107. Martinez-Climent, J. A., M. J. Thirman, et al. (1995). "Detection of 11q23/MLL rearrangements in infant leukemias with fluorescence in situ hybridization and molecular analysis." *Leukemia* 9(8): 1299-304.
108. Matthews, W., C. T. Jordan, et al. (1991). "A receptor tyrosine kinase specific to hematopoietic stem and progenitor cell-enriched populations." *Cell* 65(7): 1143-52.
109. Megonigal, M. D., N. K. Cheung, et al. (2000). "Detection of leukemia-associated MLL-GAS7 translocation early during chemotherapy with DNA topoisomerase II inhibitors." *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(6): 2814-9.
110. Melnick, A. and J. D. Licht (1999). "Deconstructing a disease: RARalpha, its fusion partners, and their roles in the pathogenesis of acute promyelocytic leukemia." *Blood* 93(10): 3167-215.
111. Meshinchi, S., W. G. Woods, et al. (2001). "Prevalence and prognostic significance of Flt3 internal tandem duplication in pediatric acute myeloid leukemia." *Blood* 97(1): 89-94.
112. Metzler, M., P. L. Strissel, et al. (2004). "Emergence of translocation t(9;11)-positive leukemia during treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia." *Genes Chromosomes Cancer* 41(3): 291-6.
113. Meyer, C., B. Schneider, et al. (2006). "The MLL recombinome of acute leukemias." *Leukemia* 20(5): 777-84.
114. Meyer, C., B. Schneider, et al. (2005). "Diagnostic tool for the identification of MLL rearrangements including unknown partner genes." *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(2): 449-54.
115. Meyers, S., J. R. Downing, et al. (1993). "Identification of AML-1 and the (8;21) translocation protein (AML-1/ETO) as sequence-specific DNA-binding proteins: the runt homology domain is required for DNA binding and protein-protein interactions." *Mol Cell Biol* 13(10): 6336-45.
116. McHale, C. M., J. L. Wiemels, et al. (2003). "Prenatal origin of childhood acute myeloid leukemias harboring chromosomal rearrangements t(15;17) and inv(16)." *Blood* 101(11): 4640-1.
117. McHale, C. M., J. L. Wiemels, et al. (2003). "Prenatal origin of TEL-AML1-positive acute lymphoblastic leukemia in children born in California." *Genes Chromosomes Cancer* 37(1): 36-43.
118. Micallef, I. N., D. M. Lillington, et al. (2000). "Therapy-related myelodysplasia and secondary acute myelogenous leukemia after high-dose therapy with autologous hematopoietic progenitor-cell support for lymphoid malignancies." *J Clin Oncol* 18(5): 947-55.
119. Miller, S. A., D. D. Dykes, et al. (1988). "A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells." *Nucleic Acids Res* 16(3): 1215.

120. Minucci, S. and P. G. Pelicci (1999). "Retinoid receptors in health and disease: co-regulators and the chromatin connection." *Semin Cell Dev Biol* 10(2): 215-25.
121. Miyoshi, H., K. Shimizu, et al. (1991). "t(8;21) breakpoints on chromosome 21 in acute myeloid leukemia are clustered within a limited region of a single gene, AML1." *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(23): 10431-4.
122. Mori, H., S. M. Colman, et al. (2002). "Chromosome translocations and covert leukemic clones are generated during normal fetal development." *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(12): 8242-7.
123. Mulloy, J. C., J. Cammenga, et al. (2003). "Maintaining the self-renewal and differentiation potential of human CD34+ hematopoietic cells using a single genetic element." *Blood* 102(13): 4369-76.
124. Mulloy, J. C., J. Cammenga, et al. (2002). "The AML1-ETO fusion protein promotes the expansion of human hematopoietic stem cells." *Blood* 99(1): 15-23.
125. Nakao, M., S. Yokota, et al. (1996). "Internal tandem duplication of the flt3 gene found in acute myeloid leukemia." *Leukemia* 10(12): 1911-8.
126. Ng, A., P. F. Ravetto, et al. (2004). "Coexistence of treatment-related MLL cleavage and rearrangement in a child with haemophagocytic lymphohistiocytosis." *Br J Cancer* 91(12): 1990-2.
127. Nucifora, G., D. J. Birn, et al. (1993). "Detection of DNA rearrangements in the AML1 and ETO loci and of an AML1/ETO fusion mRNA in patients with t(8;21) acute myeloid leukemia." *Blood* 81(4): 883-8.
128. O'Farrell, A. M., T. J. Abrams, et al. (2003). "SU11248 is a novel FLT3 tyrosine kinase inhibitor with potent activity in vitro and in vivo." *Blood* 101(9): 3597-605.
129. Okuda, T., J. van Deursen, et al. (1996). "AML1, the target of multiple chromosomal translocations in human leukemia, is essential for normal fetal liver hematopoiesis." *Cell* 84(2): 321-30.
130. Perrillat, F., J. Clavel, et al. (2002). "Day-care, early common infections and childhood acute leukaemia: a multicentre French case-control study." *Br J Cancer* 86(7): 1064-9.
131. Petridou, E., D. Kassimos, et al. (1993). "Age of exposure to infections and risk of childhood leukaemia." *Bmj* 307(6907): 774.
132. Pongers-Willemse, M. J., T. Seriu, et al. (1999). "Primers and protocols for standardized detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia using immunoglobulin and T cell receptor gene rearrangements and TAL1 deletions as PCR targets: report of the BIOMED-1 CONCERTED ACTION: investigation of minimal residual disease in acute leukemia." *Leukemia* 13(1): 110-8.
133. Poppe, B., H. Van Limbergen, et al. (2001). "Chromosomal aberrations in Bloom syndrome patients with myeloid malignancies." *Cancer Genet Cytogenet* 128(1): 39-42.
134. Prasad, R., Y. Gu, et al. (1993). "Cloning of the ALL-1 fusion partner, the AF-6 gene, involved in acute myeloid leukemias with the t(6;11) chromosome translocation." *Cancer Res* 53(23): 5624-8.
135. Preston, D. L., S. Kusumi, et al. (1994). "Cancer incidence in atomic bomb survivors. Part III. Leukemia, lymphoma and multiple myeloma, 1950-1987." *Radiat Res* 137(2 Suppl): S68-97.

136. Pui, C. H., M. Schrappe, et al. (2004). "Childhood and adolescent lymphoid and myeloid leukemia." *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*: 118-45.
137. Raimondi, S. C., M. N. Chang, et al. (1999). "Chromosomal abnormalities in 478 children with acute myeloid leukemia: clinical characteristics and treatment outcome in a cooperative pediatric oncology group study-POG 8821." *Blood* 94(11): 3707-16.
138. Redner, R. L., E. A. Rush, et al. (1996). "The t(5;17) variant of acute promyelocytic leukemia expresses a nucleophosmin-retinoic acid receptor fusion." *Blood* 87(3): 882-6.
139. Rethmeier, A., A. Aggerholm, et al. (2006). "Promoter hypermethylation of the retinoic acid receptor beta2 gene is frequent in acute myeloid leukaemia and associated with the presence of CBFbeta-MYH11 fusion transcripts." *Br J Haematol* 133(3): 276-83.
140. Rhoades, K. L., C. J. Hetherington, et al. (2000). "Analysis of the role of AML1-ETO in leukemogenesis, using an inducible transgenic mouse model." *Blood* 96(6): 2108-15.
141. Richkind, K. E., T. Loew, et al. (1998). "Identical cytogenetic clones and clonal evolution in pediatric monozygotic twins with acute myeloid leukemia: presymptomatic disease detection by interphase fluorescence in situ hybridization and review of the literature." *J Pediatr Hematol Oncol* 20(3): 264-7.
142. Romana, S. P., M. Mauchauffe, et al. (1995). "The t(12;21) of acute lymphoblastic leukemia results in a tel-AML1 gene fusion." *Blood* 85(12): 3662-70.
143. Rosnet, O., D. Stephenson, et al. (1993). "Close physical linkage of the FLT1 and FLT3 genes on chromosome 13 in man and chromosome 5 in mouse." *Oncogene* 8(1): 173-9.
144. Rubnitz, J. E. and A. T. Look (1998). "Molecular genetics of childhood leukemias." *J Pediatr Hematol Oncol* 20(1): 1-11.
145. Rubnitz, J. E., J. Morrissey, et al. (1994). "ENL, the gene fused with HRX in t(11;19) leukemias, encodes a nuclear protein with transcriptional activation potential in lymphoid and myeloid cells." *Blood* 84(6): 1747-52.
146. Salomoni, P. and P. P. Pandolfi (2002). "The role of PML in tumor suppression." *Cell* 108(2): 165-70.
147. Satake, N., N. Maseki, et al. (1999). "Chromosome abnormalities and MLL rearrangements in acute myeloid leukemia of infants." *Leukemia* 13(7): 1013-7.
148. Shih, L. Y., C. F. Huang, et al. (2002). "Internal tandem duplication of FLT3 in relapsed acute myeloid leukemia: a comparative analysis of bone marrow samples from 108 adult patients at diagnosis and relapse." *Blood* 100(7): 2387-92.
149. Shih, L. Y., T. L. Lin, et al. (2004). "Internal tandem duplication of fms-like tyrosine kinase 3 is associated with poor outcome in patients with myelodysplastic syndrome." *Cancer* 101(5): 989-98.
150. Shimada, A., T. Taki, et al. (2006). "KIT mutations, and not FLT3 internal tandem duplication, are strongly associated with a poor prognosis in pediatric acute myeloid leukemia with t(8;21): a study of the Japanese Childhood AML Cooperative Study Group." *Blood* 107(5): 1806-9.
151. Shu, X. O., Y. T. Gao, et al. (1987). "Chloramphenicol use and childhood leukaemia in Shanghai." *Lancet* 2(8565): 934-7.



152. Shurtleff, S. A., A. Buijs, et al. (1995). "TEL/AML1 fusion resulting from a cryptic t(12;21) is the most common genetic lesion in pediatric ALL and defines a subgroup of patients with an excellent prognosis." *Leukemia* 9(12): 1985-9.
153. Scheijen, B., H. T. Ngo, et al. (2004). "FLT3 receptors with internal tandem duplications promote cell viability and proliferation by signaling through Foxo proteins." *Oncogene* 23(19): 3338-49.
154. Schessl, C., V. P. Rawat, et al. (2005). "The AML1-ETO fusion gene and the FLT3 length mutation collaborate in inducing acute leukemia in mice." *J Clin Invest* 115(8): 2159-68.
155. Schnittger, S., C. Schoch, et al. (2002). "Analysis of FLT3 length mutations in 1003 patients with acute myeloid leukemia: correlation to cytogenetics, FAB subtype, and prognosis in the AMLCG study and usefulness as a marker for the detection of minimal residual disease." *Blood* 100(1): 59-66.
156. Sidi, Y., D. Douer, et al. (1978). "Phenylbutazone and acute leukemia." *Med Interne* 16(4): 413-5.
157. Smith, B. D., M. Levis, et al. (2004). "Single-agent CEP-701, a novel FLT3 inhibitor, shows biologic and clinical activity in patients with relapsed or refractory acute myeloid leukemia." *Blood* 103(10): 3669-76.
158. So, C. W. and M. L. Cleary (2003). "Common mechanism for oncogenic activation of MLL by forkhead family proteins." *Blood* 101(2): 633-9.
159. Sorensen, P. H., C. S. Chen, et al. (1994). "Molecular rearrangements of the MLL gene are present in most cases of infant acute myeloid leukemia and are strongly correlated with monocytic or myelomonocytic phenotypes." *J Clin Invest* 93(1): 429-37.
160. Stary, J., P. Gajdos, et al. (2003). "[Improved results in children with acute lymphoblastic leukemia treated with the ALL-BFM 90 protocol in the Czech Republic]." *Cas Lek Cesk* 142(7): 404-9.
161. Stock, W., M. J. Thirman, et al. (1994). "Detection of MLL gene rearrangements in adult acute lymphoblastic leukemia. A Cancer and Leukemia Group B study." *Leukemia* 8(11): 1918-22.
162. Super, H. J., N. R. McCabe, et al. (1993). "Rearrangements of the MLL gene in therapy-related acute myeloid leukemia in patients previously treated with agents targeting DNA-topoisomerase II." *Blood* 82(12): 3705-11.
163. Tallman, M. S., C. Nabhan, et al. (2002). "Acute promyelocytic leukemia: evolving therapeutic strategies." *Blood* 99(3): 759-67.
164. Taub, J. W., M. A. Konrad, et al. (2002). "High frequency of leukemic clones in newborn screening blood samples of children with B-precursor acute lymphoblastic leukemia
165. Transcriptional regulation of cell-specific expression of the human cystathionine beta -synthase gene by differential binding of Sp1/Sp3 to the -1b promoter
166. Transcriptional regulation of the human cystathionine beta-synthase -1b basal promoter: synergistic transactivation by transcription factors NF-Y and Sp1/Sp3." *Blood* 99(8): 2992-6.
167. Teuffel, O., D. R. Betts, et al. (2005). "Clonal expansion of a new MLL rearrangement in the absence of leukemia." *Blood* 105(10): 4151-2.

168. Tkachuk, D. C., S. Kohler, et al. (1992). "Involvement of a homolog of *Drosophila* trithorax by 11q23 chromosomal translocations in acute leukemias." *Cell* 71(4): 691-700.
169. Tobal, K., P. R. Johnson, et al. (1995). "Detection of CBFβ/MYH11 transcripts in patients with inversion and other abnormalities of chromosome 16 at presentation and remission." *Br J Haematol* 91(1): 104-8.
170. Tse, K. F., E. Novelli, et al. (2001). "Inhibition of FLT3-mediated transformation by use of a tyrosine kinase inhibitor." *Leukemia* 15(7): 1001-10.
171. Tsuzuki, S., M. Seto, et al. (2004). "Modeling first-hit functions of the t(12;21) TEL-AML1 translocation in mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(22): 8443-8.
172. Usuki, K., M. Nakatsu, et al. (1996). "CBFβ/MYH11 fusion transcripts in a case of acute myelogenous leukemia (M1) with partial deletion of the long arm of chromosome 16." *Intern Med* 35(4): 327-30.
173. Wang, J., T. Hoshino, et al. (1998). "ETO, fusion partner in t(8;21) acute myeloid leukemia, represses transcription by interaction with the human N-CoR/mSin3/HDAC1 complex." *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(18): 10860-5.
174. Wang, L., D. Lin, et al. (2005). "Analysis of FLT3 internal tandem duplication and D835 mutations in Chinese acute leukemia patients." *Leuk Res* 29(12): 1393-8.
175. Wells, R. A., C. Catzavelos, et al. (1997). "Fusion of retinoic acid receptor alpha to NuMA, the nuclear mitotic apparatus protein, by a variant translocation in acute promyelocytic leukaemia." *Nat Genet* 17(1): 109-13.
176. Wiemels, J. L., G. Cazzaniga, et al. (1999). "Prenatal origin of acute lymphoblastic leukaemia in children." *Lancet* 354(9189): 1499-503.
177. Wiemels, J. L., B. C. Leonard, et al. (2002). "Site-specific translocation and evidence of postnatal origin of the t(1;19) E2A-PBX1 fusion in childhood acute lymphoblastic leukemia." *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(23): 15101-6.
178. Wiemels, J. L., Z. Xiao, et al. (2002). "In utero origin of t(8;21) AML1-ETO translocations in childhood acute myeloid leukemia." *Blood* 99(10): 3801-5.
179. Xu, F., T. Taki, et al. (1999). "Tandem duplication of the FLT3 gene is found in acute lymphoblastic leukaemia as well as acute myeloid leukaemia but not in myelodysplastic syndrome or juvenile chronic myelogenous leukaemia in children." *Br J Haematol* 105(1): 155-62.
180. Xu, L., C. K. Glass, et al. (1999). "Coactivator and corepressor complexes in nuclear receptor function." *Curr Opin Genet Dev* 9(2): 140-7.
181. Yagi, H., K. Deguchi, et al. (1998). "Growth disturbance in fetal liver hematopoiesis of Mll-mutant mice." *Blood* 92(1): 108-17.
182. Yagi, T., S. Hibi, et al. (2000). "Detection of clonotypic IGH and TCR rearrangements in the neonatal blood spots of infants and children with B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia." *Blood* 96(1): 264-8.
183. Yamamoto, T., M. Isomura, et al. (2006). "PTPN11, RAS and FLT3 mutations in childhood acute lymphoblastic leukemia." *Leuk Res*.
184. Yamamoto, Y., H. Kiyoi, et al. (2001). "Activating mutation of D835 within the activation loop of FLT3 in human hematologic malignancies." *Blood* 97(8): 2434-9.
185. Yang, X., L. Liu, et al. (2005). "The FLT3 Internal tandem duplication mutation prevents apoptosis in interleukin-3-deprived BaF3 cells due to protein kinase A and

- ribosomal S6 kinase 1-mediated BAD phosphorylation at serine 112." *Cancer Res* 65(16): 7338-47.
186. Yokota, S., H. Kiyoi, et al. (1997). "Internal tandem duplication of the FLT3 gene is preferentially seen in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome among various hematological malignancies. A study on a large series of patients and cell lines." *Leukemia* 11(10): 1605-9.
  187. Yokoyama, A., Z. Wang, et al. (2004). "Leukemia proto-oncoprotein MLL forms a SET1-like histone methyltransferase complex with menin to regulate Hox gene expression." *Mol Cell Biol* 24(13): 5639-49.
  188. Yu, B. D., R. D. Hanson, et al. (1998). "MLL, a mammalian trithorax-group gene, functions as a transcriptional maintenance factor in morphogenesis." *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(18): 10632-6.
  189. Yu, B. D., J. L. Hess, et al. (1995). "Altered Hox expression and segmental identity in Mll-mutant mice." *Nature* 378(6556): 505-8.
  190. Yuan, Y., L. Zhou, et al. (2001). "AML1-ETO expression is directly involved in the development of acute myeloid leukemia in the presence of additional mutations." *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(18): 10398-403.
  191. Zhadanov, A. B., D. W. Provance, Jr., et al. (1999). "Absence of the tight junctional protein AF-6 disrupts epithelial cell-cell junctions and cell polarity during mouse development." *Curr Biol* 9(16): 880-8.
  192. Zheng, R., A. D. Friedman, et al. (2004). "Internal tandem duplication mutation of FLT3 blocks myeloid differentiation through suppression of C/EBPalpha expression." *Blood* 103(5): 1883-90.
  193. Ziemer-van der Poel, S., N. R. McCabe, et al. (1991). "Identification of a gene, MLL, that spans the breakpoint in 11q23 translocations associated with human leukemias." *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(23): 10735-9.
  194. Ziino, O., R. Rondelli, et al. (2006). "Acute lymphoblastic leukemia in children with associated genetic conditions other than Down's syndrome. The AIEOP experience." *Haematologica* 91(1): 139-40.
  195. Zipursky, A., M. Peeters, et al. (1987). "Megakaryoblastic leukemia and Down's syndrome--a review." *Prog Clin Biol Res* 246: 33-56.
  196. Zuna, J., O. Hrusak, et al. (1999). "TEL/AML1 positivity in childhood ALL: average or better prognosis? Czech Paediatric Haematology Working Group." *Leukemia* 13(1): 22-4.
  197. Zuna, J., K. Muzikova, et al. (2003). "Pre-natal, clonal origin of acute lymphoblastic leukaemia in triplets." *Leuk Lymphoma* 44(12): 2099-102.
  198. Zwaan, C. M., S. Meshinchi, et al. (2003). "FLT3 internal tandem duplication in 234 children with acute myeloid leukemia: prognostic significance and relation to cellular drug resistance." *Blood* 102(7): 2387-94.

## **Prilohy**